

## 흰쥐의 대퇴동맥 혈전 모델에서의 스트렙토키나제-덱스트란 포합체의 혈전용해효과의 평가

김양우 · 김동출<sup>†</sup>

충남대학교 약학대학  
(1999년 6월 5일 접수)

### Evaluation of Thrombolytic Effect of Streptokinase-Dextran Conjugate in a Rat Model of Arterial Thrombosis

Yang-Woo Kim and Dong-Chool Kim<sup>†</sup>

College of Pharmacy, Chungnam National University, Taejon 305-764, Korea

(Received June 5, 1999)

**ABSTRACT**—To evaluate the thrombolytic activity of streptokinase-dextran conjugate, a rat model of arterial thrombosis was used. Briefly, the femoral artery was exposed and a filter paper saturated with 70% FeCl<sub>3</sub> solution was placed around the femoral artery in order to stop the blood flow. Six minutes after the stop of the blood flow in the femoral artery, streptokinase (10000~30000 units per rat) or streptokinase-dextran conjugate (5000~17000 units per rat) was administered by i.v. bolus injection through the femoral vein. Then the blood flow in the femoral artery was monitored using a Doppler laser flow meter. The i.v. bolus administration of streptokinase could not restore the blood flow in the femoral artery in the dose range of 10000~30000 units per rat. The i.v. bolus administration of streptokinase-dextran conjugate could restore the blood flow in the femoral artery in the dose range of 5000~17000 units per rat. A good correlation between the dose of streptokinase-dextran conjugate and the total thrombolytic effect was observed. In addition, the lag time between the injection of streptokinase-dextran conjugate and the restoring of the blood flow was decreased as the i.v. dose of streptokinase-dextran conjugate increased. These results show the superior beneficial effect of streptokinase-dextran conjugate compared with the unconjugated streptokinase with respect to the elongation of thrombolytic activity, the administration method (single injection versus continuous infusion), and the reduced dose necessary for a equivalent thrombolytic effect.

**Keywords**—Streptokinase, Dextran, Conjugate, Arterial thrombolysis model

선진국에서 전체 사망률의 36~39%는 심혈관계 질환에 의한 것으로 집계되고 있다.<sup>1)</sup> 최근 우리나라에서도 식생활의 선진화, 서구화가 진행됨에 따라 선진국과 같이 심혈관계 질환으로 사망하는 인구수가 점차 증가하고 있다. 이들 질환의 치료를 위해 쓰이는 혈전용해제로서 streptokinase, urokinase, tissue-type plasminogen activator (tPA), prourokinase 등이 있는데, 이들 중에서 streptokinase는 가장 먼저 발견되어 널리 쓰이고 있는 혈전용해제 중의 하나이며, 또한 그 가격이 다른 혈전용해제와 비교하여 매우 저렴하므로 의약품으로서 유리한 점들을 가지고 있다.<sup>1)</sup> Streptokinase (SK)는  $\beta$ -hemolytic streptococci에 의해 생성되는 분자량 47000의 단백질이다.<sup>2,3)</sup> SK 자신은 어떤 효소활성도 가지고 있지 않으나 혈중의 plasminogen과 결합하여 활성화되어 plasminogen의 Arg-561-Val-562 부위를 절단함으로써 plasmin

을 유리시킨다.<sup>4,8)</sup> SK는 deep vein thrombosis, pulmonary embolism, acute myocardial infarction 등의 치료에 사용되어져 왔다.<sup>9-11)</sup> 이와 같이 SK는 매우 강력한 혈전용해활성을 가지고 있으나 사람에게 SK를 정맥주사 후 분포상의 반감기가 약 11~17분, 분포후상에서의 반감기가 약 83분으로 보고되어 있다.<sup>12)</sup> SK의 이와 같은 짧은 혈중반감기로 인해 SK는 주로 혈전이 생성되어 있는 부위에 국소적으로 정맥주입을 계속하는 방법이 사용되고 있다. 이와 같은 SK의 단점을 보완하기 위해 SK를 평균분자량 40000의 dextran과 결합시켜 만든 지속성 SK, streptokinase-dextran conjugate(SK-DEX conjugate)에 대해 그 효능을 평가하기 위해 흰쥐에서 혈전을 유발시킨 동물모델<sup>13)</sup>을 이용하였다. SK는 비교적 새롭게 생성된 혈전을 용해하는데 있어서 강력한 효과를 보인다. 따라서 본 논문에서는 FeCl<sub>3</sub>를 흰쥐의 대퇴동맥에 적가함으로써 혈전을 생성시킨 뒤, 6분이 경과한 후에 약물을 정맥주사함으로써 비교적 새롭게 생성된 혈전을 용해하는 모델을 작성하였다. 이 동물 모델을 사용하

<sup>†</sup>본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로  
Tel : 042)821-5936, E-mail : dongchk@hanbat.chungnam.ac.kr

여 SK와 SK-DEX conjugate의 혈전용해 효능에 관해 연구하였다.

**실험방법**

**시약 및 기기**

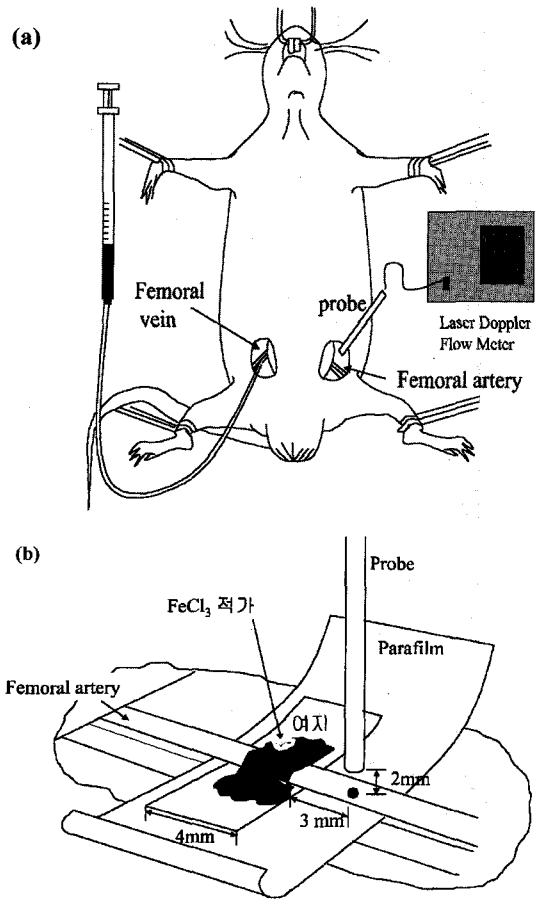
시약으로서 ethyl alcohol은 Hayman limited(U.K.)에서, sodium chloride, ferric chloride anhydrous, heparin은 Sigma Co.(MO, USA)에서 구입하여 사용하였다. Streptokinase(SK) 및 streptokinase-dextran conjugate (SK-DEX)는 동국제약으로부터 공급 받았다. 사용된 증류수는 Mill-Q(Millipore Co., USA)에 18MΩ-cm로 통과시킨 것을 사용하였으며 기타 시약은 모두 특급의 것을 구입하여 사용하였다. 혈류측정에는 Laser Doppler Blood Flow Meter (Moor Instruments Ltd, England)를 사용하였으며, 분석 프로그램으로 DRTSOFT V2.9(Moor Instruments Ltd, England)을 이용하였다.

**실험 동물**

삼육 실험 동물로부터 Sprague-Dawley계 흰쥐를 구입하여 충남대학교 약학대학 동물 사육실에서 사료와 물을 자유로이 섭취할 수 있는 환경(20-25°C, 50-60% RH) 하에서 1주일 이상 적응시킨 후 350~450 g이 되었을 때 사용하였다.

**혈전의 유발**

Scheme 1(a)에 보인 바와 같이 Sprague-Dawley계 흰쥐를 ethyl carbamate(1.5~2 g/kg i.p.)로 마취한 후, 약물의 정맥내 투여를 위하여 흰쥐의 오른쪽 대퇴정맥에 PE-50 polyethylene tubing(i.d. 0.58 mm, o.d. 0.965 mm, Intramedic Clay Adams, USA)을 삽입하였다. 그리고 혈류를 측정하기 위하여, 왼편 대퇴동맥을 노출시키고 동맥 위에 Doppler laser flow meter의 probe를 scheme-1(b)와 같이 위치시켰다. 대퇴동맥에 혈전을 유발시킬 때 FeCl<sub>3</sub> 용액이 퍼지는 것을 막기위해 대퇴동맥 밑으로 parafilm을 깔았다(scheme 1(b)). 그리고 parafilm위에 whatman filter paper를 가로 4 mm, 세로 2 mm로 절단하여 동맥을 감싸듯 깔아주고 그 위에 70% FeCl<sub>3</sub> 용액을 50 μl를 가하여 혈전을 생성시켰다. 이때 probe 끝에 FeCl<sub>3</sub> 용액이 묻지 않도록 혈관부터 probe까지 약 2 mm의 간격을 두었다. 또 혈전유발 부위로부터 아래쪽으로 3 mm 떨어진 위치에 대퇴동맥 혈류를 monitor 할 수 있도록 probe를 위치시켰다. Laser doppler flow meter는 일단 위치 선정이 끝나면 위치가 바뀌지 않도록 주의하였다.



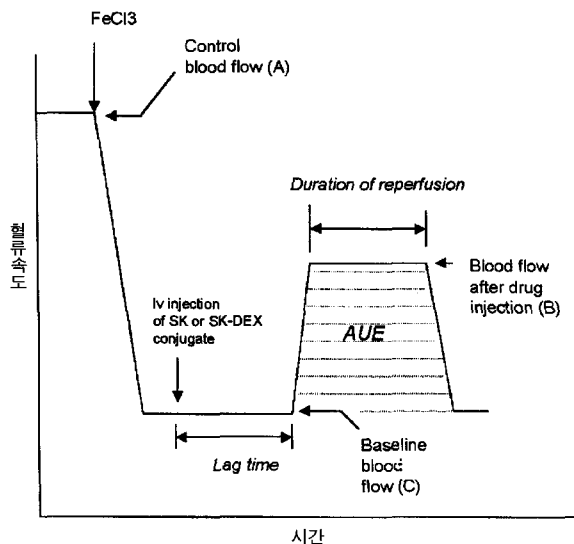
**Scheme 1**—(a) Schematic representation of the experimental set-up of the rat arterial thrombosis model. (b) Schematic representation of the femoral artery setting for the application of 70% FeCl<sub>3</sub> solution and location of the laser doppler flow meter probe over the femoral artery.

**흰쥐에서의 SK 및 SK-DEX conjugate의 정맥주사에 의한 투여**

앞에서 설명한 방법에 따라 SD계 흰쥐의 왼쪽 대퇴동맥과 오른쪽 대퇴정맥을 시술한 후, 여러가지의 투여량의 SK (10000, 20000, 30000 units per rat) 또는 SK-DEX conjugate(5000, 9000, 10200, 17000 units per rat)를 대퇴정맥을 통하여 순간적으로 주사한 후 0.5 ml의 생리식염수(50 IU/ml의 heparin 함유)를 밀어 넣어 cannula중에 남아 있는 약물을 모두 투여하였다.

**SK 및 SK-DEX conjugate의 혈전용해활성의 평가**

Scheme 1(b)와 같이 probe를 왼쪽 대퇴 동맥 위에 2 mm의 간격을 두어 고정시키고 혈류 속도를 관찰하면서 15분 정도 기다려 일정한 혈류 속도가 얻어지면 그 시점을 시작으로 하여 약 5분간 혈류속도를 대조 혈류속도로서 측정한 후 70% FeCl<sub>3</sub>를 50 μl를 가하여 혈전을 유발시켰다. 혈류



**Scheme 2**—Diagram of experimental procedure for the induction of thrombosis in the femoral artery and for the i.v. bolus injection of SK or SK-DEX conjugate. AUE represents the area under the blood flow versus time curve from the beginning of the reperfusion to the end of the reperfusion which is shown as the hatched area. Lag time represents the time interval between the i.v. bolus injection of drug and the time when the reperfusion of the blood flow was begun. Reperfusion time represents the time interval during which the reperfusion of blood flow was continued after i.v. bolus administration of drug.

속도가 감소하여 더 이상 변하지 않으면 base-line에 도달한 것으로 간주하고, base line에 도달한 뒤 약 6분 후에 SK 혹은 SK-DEX conjugate를 오른쪽 대퇴정맥을 통하여 정맥 내주사에 의해 투여하였다. 이상의 실험과정을 scheme 2에 모식적으로 요약하였다. 혈전 용해 활성은 아래의 (1)식을 이용하여 계산하였다. 즉, 혈전 유발전의 대조 혈류속도(A)와 base-line혈류속도(C)의 차에 대한 혈전 유발 상태에서 약물 투여 후의 혈류속도(B)와 base-line혈류속도(C)의 차의 비로 평가하였다.

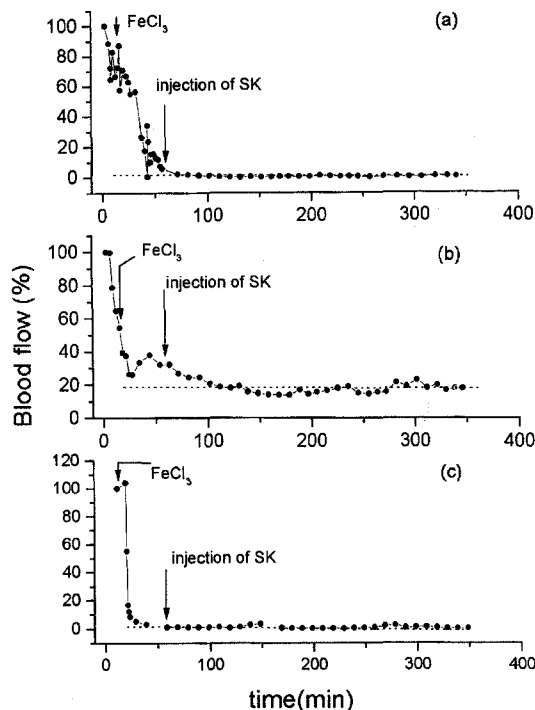
$$\text{Recovery of blood flow rate (\%)} = (B-C) / (A-C) \times 100 \quad (1)$$

또한 SK 및 SK-DEX conjugate의 혈전용해활성을 나타내는 파라미터로서 AUE, reperfusion time, lag time 등도 측정하였다. 이들 파라미터들이 의미하는 바는 scheme 2에 요약하였다.

### 결과 및 고찰

#### SK 정맥주사 후의 혈전용해 활성의 평가

실험방법에서 전술한 방법으로 대퇴동맥에 혈전을 생성시



**Figure 1**—Time profile of the blood flow rate in the femoral artery following i.v. bolus administration of SK after the formation of thrombosis in the femoral artery by the application of the 70% FeCl<sub>3</sub> solution. The dotted line represents the base-line blood flow. The i.v. doses of SK are as follows; (a) 10000 units per rat, (b) 20000 units per rat, (c) 30000 units per rat.

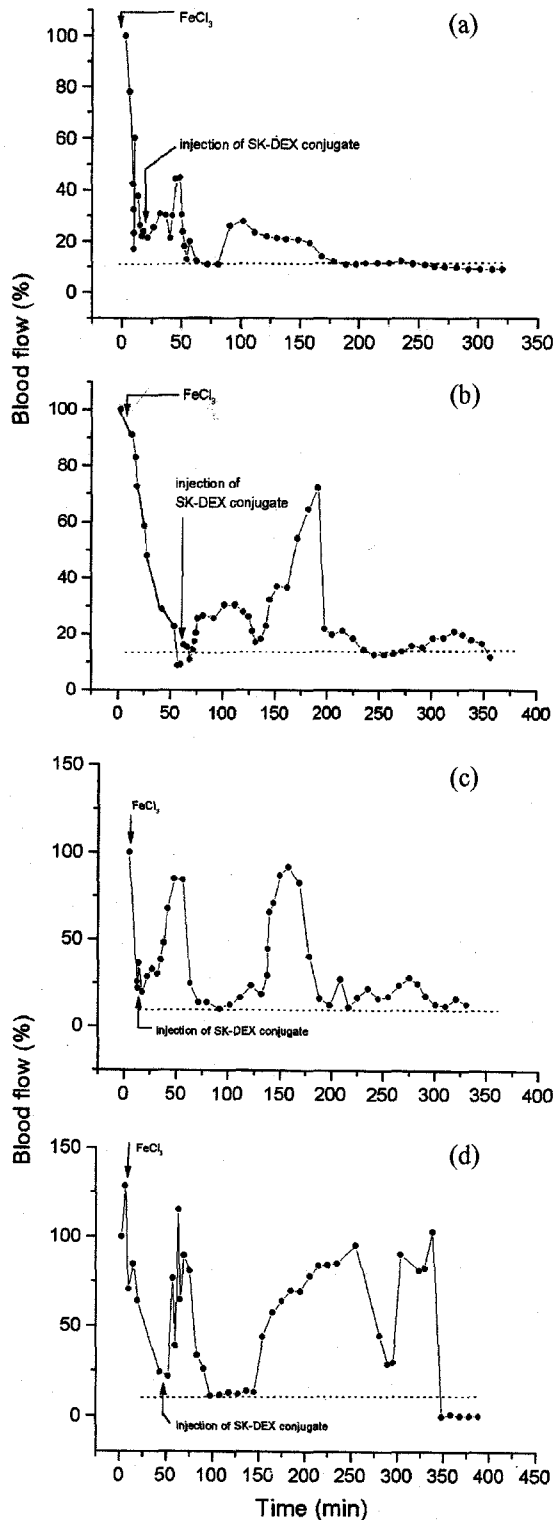
킨 후 SK를 정맥주사하여 얻은 혈류의 경시적 변화를 Figure 1에 나타내었다. SK의 경우에는 정맥주사에 의한 투여량이 약 1만~3만 units의 범위에서 baseline까지 떨어진 혈류가 다시 회복되지 않았다. 이것은 SK의 혈중 반감기가 매우 짧기 때문에 신속하게 혈중에서 제거되어 대퇴동맥에 생성된 혈전을 녹일 수 있는 SK의 유효 혈중 농도가 충분한 시간 유지되지 않았기 때문이라고 생각된다.

#### SK-DEX conjugate 정맥주사 후 혈전용해활성의 평가

실험방법에서 전술한 방법으로 대퇴동맥에 혈전을 생성시킨 후, SK-DEX conjugate를 정맥주사로 투여했을 때의 혈류의 경시적 변화를 Figure 2에 나타내었다. SK와는 달리 SK-DEX conjugate의 경우 각각 약 1.7만, 1만, 5천 units의 투여량에서 분명한 혈전 용해 효과가 관찰되었다. Figure 2에서 투여 초기에 혈류속도가 약간 증가하였다가 다시 떨어지고 시간이 경과하면 다시 혈류가 흐르는 현상이 관찰되었다.

#### SK-DEX conjugate의 혈전용해작용의 투여량 의존성

이상 SK-DEX conjugate의 혈전용해 활성을 실험방법에서



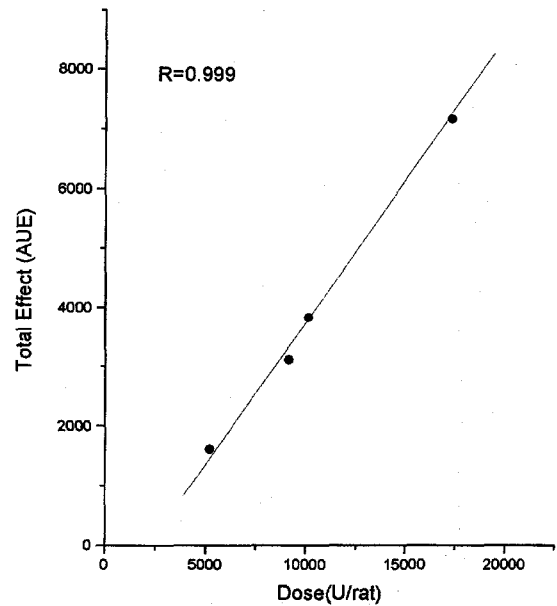
**Figure 2**—Time profile of the blood flow rate in the femoral artery following i.v. bolus administration of SK-DEX conjugate after the formation of thrombosis in the femoral artery by the application of the 70% FeCl<sub>3</sub> solution. The dotted line represents the base-line blood flow. The i.v. doses of SK-DEX conjugate are as follows; (a) 5000 units per rat, (b) 9000 units per rat, (c) 10200 units per rat, (d) 17000 units per rat.

서술한 방법에 따라 여러가지 파라미터의 형태로 정리한 것이 Table I이다. 먼저 SK-DEX conjugate의 총 혈전용해활성을 나타내는 지표인 AUE는 SK-DEX conjugate의 투여량이 5000, 10000, 17000 units로 증가함에 따라 비례적으로 증가하는 것이 관찰되었다(Figure 3). 또 SK-DEX conjugate의 투여량의 증가에 비례하여 혈류가 다시 흐르는 지속시간(reperfusion time)이 연장되는 것이 관찰되었다(Figure 4). 한편, SK-DEX conjugate의 투여량의 증가에 비례하여 혈전을

**Table I**—Summary of Thrombolytic Parameters of SK and SK-DEX Conjugate in a Rat Arterial Thrombosis Model

Drug	Dose (units/rat)	AUE (% · min)	Lag time (min)	Reperfusion time (min)
SK	10000 ~ 30000	N.D.	N.D.	N.D.
	5000	1615	24.0	66.0
SK-DEX conjugate	9000	3116	11.7	116
	10200	3830	14.2	126
	17000	7165	5.30	222

AUE represents the area under the blood flow versus time curve in the interval during the blood flow was restored, calculated by a trapezoidal rule. Lag time is the time interval between the i.v. injection of drug and the time when the blood flow restores. Reperfusion time is the time interval during the blood flow is restored after the i.v. injection of drug. See details in the scheme 2.



**Figure 3**—Correlation of dose and thrombolytic effect of SK-DEX conjugate. The thrombolytic effect was represented by AUE(area under the effect (blood flow rate) versus time profile from the start of the reperfusion to the end of the reperfusion following i.v. bolus administration of SK-DEX conjugate. The AUE value was calculated by using a trapezoidal rule. The solid line represents a linear regression.

용해하는 속도가 빨라지는 것도 관찰되었다(Figure 5).

## 결론

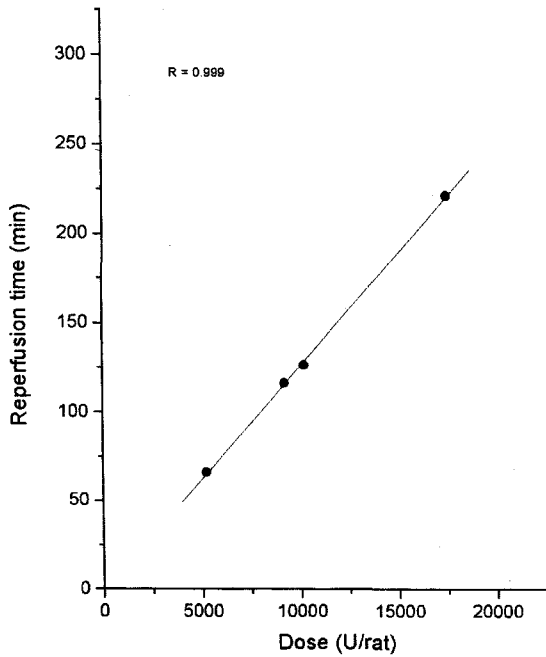
왼쪽 대퇴동맥에 혈전을 유발시킨 흰쥐 모델에 SK 및 SK-DEX conjugate를 오른쪽 대퇴정맥을 통하여 정맥주사한 후 혈전용해 활성을 대퇴동맥의 혈류를 경시적으로 monitoring 함으로써 평가하였다. SK 10000~30000 units를 정맥주사 후에도 혈전용해 효과는 관찰되지 않았다. 한편 SK-DEX conjugate는 5000, 10000, 17000 units의 정맥주사 후 투여량에 비례하여 혈전용해 활성이 증가하는 것이 관찰되었으며, 혈류의 reperfusion 지속시간, SK-DEX conjugate 투여후 reperfusion이 시작하기까지의 lag time에도 투여량 의존성이 관찰되었다. 이상의 실험결과로부터 본 연구에서 사용한 SK-DEX conjugate가 정맥내 주사에 의해 투여된 후 혈전용해 활성을 보이는 것이 관찰되었다. 기존의 SK가 짧은 혈중 반감기로 인하여 전신적 투여에 의해서는 거의 치료효과를 거둘 수 없으므로 국소적인 점적정주에 의해서만 투여되는 점을 생각하면, 본 연구에서 관찰된 바와 같이 SK-DEX conjugate가 전신적으로 투여된 후에도 혈전용해활성을 나타낸 것은 치료방법 및 적용범위를 크게 개선시킨 것이 된다. 또한 기존의 SK는 지속적인 점적정주에 의해서만 치료활성을 나타낼 수 있는 것과 비교하여 본 연구에서 사용한 SK-DEX conjugate는 1회의 정맥주사에 의해서도 장시간 혈전용해 효과를 나타내는 것이 관찰되었다. 요약하면 기존의 SK를 사용한 치료법에 비교하여, SK-DEX conjugate를 사용함으로써 투여방법의 간편화(점적정주에서 정맥주사), 반복투여 횟수의 감소(지속성화), 투여량의 감소의 효과를 얻을 수 있는 것이 관찰되었다. 앞으로 임상에서 SK-DEX conjugate의 효능이 확인되면 기존의 SK에 대신하여 심혈관계 질환의 치료에 크게 활용될 수 있을 것으로 기대된다.

## 감사의 말씀

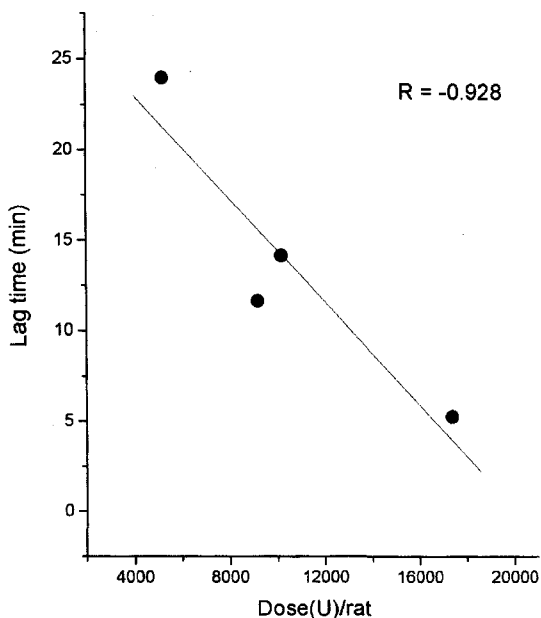
이 연구는 98년 보건복지부의 지원에 의해 수행된 것으로 깊이 감사드리며, 연구수행에 지도와 격려를 아끼지 않으신 충남대학교 약학대학의 지용길교수님과 SK 및 SK-DEX conjugate를 공급하여 주신 동국제약의 박진규, 최희성, 윤덕중씨께 감사드립니다.

## 문헌

- 1) A.V. Maksimenko, Molecular interactions in fibrinolysis. Search for new plasminogen activators, *Molecular Biology*, **29**,



**Figure 4**—Relationship between dose and reperfusion time of SK-DEX conjugate. The reperfusion time represents the time interval between the start of the reperfusion and the end of the reperfusion. The solid line represents a linear regression.



**Figure 5**—Relationship between dose and lag time relationship of SK-DEX conjugate. The lag time means the time interval between the i.v. injection of SK-DEX conjugate and the time when the reperfusion of blood flow begins. The solid line represents a linear regression.

- 20-31 (1995).
- 2) F.J. Castellino, J.M. Sodetz and W.J. Siefring GE, Streptokinase, *Methods in Enzymology*, **45**, 244-256 (1976).
  - 3) R.N. Brogden, T.M. Speight and G.S. Avery, Streptokinase : a review of its clinical pharmacology, mechanism of action and therapeutic uses, *Drugs*, **5**, 357-445 (1973).
  - 4) D.K. McClintock and P.H. Bell, Mechanism of activation of human plasminogen by streptokinase, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **43**, 694-702 (1971).
  - 5) K.N.N. Reddy and G. Markus, Mechanism of activation of human plasminogen by streptokinase : presence of an active center in streptokinase-plasminogen complex, *J. Biol. Chem.*, **247**, 1683-1691 (1972).
  - 6) G. Markus, J.L. Evers and G.H. Hobika, Activator activities of the transient forms of the human plasminogen-streptokinase complex during its proteolytic conversion to the stable activator complex, *J. Biol. Chem.*, **251**, 6495-6504 (1976).
  - 7) M. Gonzalez-Gronow, C.E. Siefring and F.J. Castellino, The mechanism of activation of human plasminogen by the activator complex streptokinase-plasmin, *J. Biol. Chem.*, **253**, 1090-1094 (1978).
  - 8) R.C. Wohl, L. Summarial, L. Arzadon and K.C. Robbins, Steady-state kinetics of activation of human and bovine plasminogens by streptokinase and its equimolar complexes with various activated forms of human plasminogen, *J. Biol. Chem.*, **253**, 1402-1407 (1978).
  - 9) G.V.R.K. Sharma, G. Cella, A.F. Parisi and A.A. Sasahara, Thrombolytic therapy, *N. Engl. J. Med.*, **306**, 1268-1276 (1982).
  - 10) V.J. Marder, The use of thrombolytic agents : choice of patient, drug administration, laboratory monitoring, *Ann. Intern. Med.*, **90**, 802-808 (1979).
  - 11) S. Sherry, W.R. Bell, F.H. Duckert, A.P. Fletcher, V. Gurewich, D.M. Loug, V.J. Marder, H. Roberts, E.W. Saltzman, A. Sasahara and M. Verstraete, Thrombolytic therapy in thrombosis : a National Institutes of Health consensus development conference, *Ann. Intern. Med.*, **93**, 141-144 (1980).
  - 12) A.D. Fletcher, N. Alkjaersig and S. Sherry, The clearance of heterologous protein from the circulation of normal and immunized man, *J. Clin. Invest.*, **37**, 1306-1315 (1959).
  - 13) E.M. Lyle, S.D. Lewis, E.D. Lehman, S.J. Gardell, S.L. Motzel and J.J. Lynch Jr, Assessment of thrombin inhibitor efficacy in a novel rabbit model of simultaneous arterial and venous thrombosis, *Thromb. Haemost.*, **79**, 656-662 (1998).