

В.Н. НИКАНДРОВ, Ю.М. СУДНИК,
действительный член АМН СССР В.И. ВОТЯКОВ

ГЕНЕРИРОВАНИЕ РАДИКАЛОВ АКТИВНОГО КИСЛОРОДА ПЛАЗМИНОГЕНОМ В СИСТЕМЕ ЛЮМИНОЛ – H_2O_2

Основные физико-химические механизмы регуляции реакций гемостаза и фибринолиза остаются изученными недостаточно. Известно, что введение в организм антиоксиданта ионола заметно активизирует фибринолиз, подавляемый при накоплении перекисей [1]. Это позволяет предположить, что функционирование фибринолитической системы может быть связано с уровнем перекисей.

В связи с этим мы исследовали взаимодействие одного из ключевых компонентов фибринолитической системы – плазминогена (Пг) с перекисью водорода.

Исследования проведены на образцах Пг человека, быка и кролика, выделенных из обогащенной β -глобулинами фракции крови или непосредственно из плазмы крови методом аффинной хроматографии на полимер-лизин-силохроме [2, 3]. При исследовании образцов Пг методом электрофореза в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия [4] в образцах Пг человека и быка выявлена одна белковая полоса, а в образцах Пг кролика – две близко расположенные полосы,

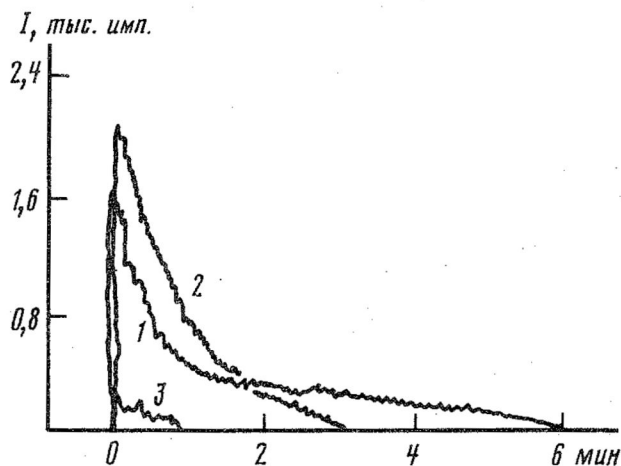


Рис. 1. Кинетика хемилюминесценции в системе люминол — H_2O_2 , индуцированной плазминогеном человека (1), кролика (2) или быка (3). Концентрация белка плазминогена в реакционной смеси 54 мкг/мл

соответствующие двум формам Пг. Активность Пг человека и кролика определена казеинолитическим методом [5] после активации стрептокиназой, а активность Пг быка — после активации урокиназой. Удельная активность образцов Пг составила

20–25 казеинолитических ед. на 1 мг белка. Белок определяли по методу Лоури [6]. Использованные в исследованиях образцы стрептокиназы (СК) получены непосредственно из культуральной жидкости после культивирования β -гемолитического стрептококка штамм Н46А путем сорбции на двуокиси кремния с элюцией 0,1 М раствором карбоната натрия [7], последующей ионообменной хроматографии на ДЭАЭ-целлюлозе в хлоридной форме в 0,05 М трис-НСl буфере рН 7,4 [8] с элюцией 0,3 М раствором хлорида натрия, осаждением этанолом при рН 5,0 и хлоридом натрия в конечной концентрации 10% при рН 2,0. Указанным выше методом электрофореза выявлена одна белковая полоса. Активность СК определяли методом лизиса фибриновых сгустков [9] и фибриновых пластин [10] с коррекцией по международному стандарту "стрептокиназа–стрептодорназа" (Лондон, ВОЗ). Удельная активность образцов СК соответствовала 100 000 МЕ на 1 мг белка.

Образование активных радикалов кислорода учитывали при 20 °С методом хемилюминесценции на описанной ранее [11] установке, работающей в режиме одноэлектронного счета фотонов. Состав реакционной смеси: 0,06 М фосфатный буфер рН 7,4 — 1,0 мл; раствор Пг, 0,75 мг/мл, — 0,1 мл; водный раствор люминола (5-амино-2,3-дигидрофталазиндион-1,4), $1,2 \cdot 10^{-4}$ М, — 0,1 мл; растворы специфических эффекторов или бидистиллированная вода — 0,1 мл; раствор перекиси водорода, $5 \cdot 10^{-3}$ М, — 0,1 мл.

В работе использовали также супероксиддисмутазу ($O_2^{\cdot-}-O_2^{\cdot-}$ — оксидоредуктазу, Е.С. I.15.1.1, СОД) фирмы "Sigma" (США), *n*-хлормеркурибензоат (ПХМБ) и *D*-маннит фирмы "хемапол" (ЧССР), этилендиаминтетраацетат натрия (ЭДТА) фирмы "Reanal" (Венгрия), азид натрия фирмы "Serva" (ФРГ), этанол, *o*-фенантролин, ϵ -аминокапроновая кислота (ϵ -АКК), казеин, фибриноген человека и тромбин человека, урокиназа ("Урокинин"), сорбенты (за исключением ДЭАЭ-целлюлозы, "Reanal") для хроматографии и неорганические соли были отечественного производства, которые подвергали дополнительной очистке. Для работы использовали бидистиллированную воду. Все исследования выполнены не менее чем 4-кратно. Результаты обработаны статистически [12].

Добавка H_2O_2 в реакционную смесь, содержащую Пг человека, вызывали практически мгновенно вспышку свечения вследствие окисления люминола радикалами активного кислорода (рис. 1). Исследование кинетики затухания свечения в координатах $\lg C \div t$ позволяет предположить наличие по крайней мере двух реакций первого порядка: быстрой с $k_I = 3,63 \pm 0,40 \cdot 10^{-2} \text{ с}^{-1}$ и более медленной с $k_{II} = 1,33 \pm 0,17 \cdot 10^{-2} \text{ с}^{-1}$. Установлено также, что конечная стадия процесса затухания соответствует кинетике нулевого порядка с константой скорости

Т а б л и ц а 1

Влияние перехватчиков активных форм кислорода и некоторых ингибиторов протенназ на хемилюминесценцию, инициируемую плазминогеном человека в системе люминол — H_2O_2

Эффектор	Концентрация, M	Светосумма, тыс. имп.	Эффектор	Концентрация, M	Светосумма, тыс. имп.
Контроль	—	$11,08 \pm 1,08$	СОД	$1,8$ (мкг/мл)	$8,40 \pm 1,50$
Азид натрия	$7,7 \cdot 10^{-4}$	$4,10 \pm 0,26^*$	ПХМБ	$6,6 \cdot 10^{-5}$	$4,30 \pm 0,80^*$
	$1,3 \cdot 10^{-2}$	$0,10 \pm 0,02^*$			
Этанол	1	$8,50 \pm 0,02^*$	ϵ -АКК	$6,5 \cdot 10^{-4}$	$3,10 \pm 1,20^*$
			ЭДТА	$6,0 \cdot 10^{-4}$	$3,10 \pm 1,20^*$
Маннит	$6,5 \cdot 10^{-3}$	$6,30 \pm 1,55^*$	<i>o</i> -Фенантролин	10^{-3}	$2,60 \pm 0,72^*$
	$1,7 \cdot 10^{-2}$	$4,60 \pm 1,78^*$			

* Отмечены изменения, статистически достоверные при $P \leq 0,05$.

$2,27 \pm 0,14$ имп/с. Зависимость количества образующихся в системе кислородных радикалов от количества Пг человека имела вид кривой с насыщением (рис. 2).

Индуктируемая в системе люминол — H_2O_2 Пг человека хемилюминесценция резко подавлялась азидом натрия. При концентрации его $1,3 \cdot 10^{-2} M$ происходило практически полное тушение (табл. 1). Введение в систему этанола или *D*-маннита подавляло хемилюминесценцию на 23% и 43–48% соответственно. Добавление СОД также вызывало тенденцию к снижению уровня хемилюминесценции. Все это свидетельствует об индуцируемом плазминогеном человека образовании кислородных радикалов — синглетного, гидроксильного, супероксидного при разложении H_2O_2 , т.е. реализации пероксидазоподобной реакции. Такая способность Пг может быть связана с присутствием в его образцах металлов с переменной валентностью. На такую вероятность указывало подавление хемилюминесценции комплексонами — ЭДТА и *o*-фенантролином на 72% и 77% соответственно. Установлено также, что модификация SH-групп молекулы Пг ПХМБ или воздействие на специфические лизинсвязывающие центры Пг с помощью ϵ -АКК также приводят к снижению образования активных форм кислорода (табл. 1).

В целях выяснения того, не является ли присутствие металлов с переменной валентностью в Пг случайной примесью и какую функциональную роль они (металлы) могут играть, изучено влияние стрептокиназы (СК) — белкового активатора Пг человека и кролика — на генерацию активных радикалов. Кроме того, исследованы Пг кролика (активируется СК) и Пг быка (очень слабо активируется СК) в отношении индуцирования ими хемилюминесценции в указанной системе.

В ходе экспериментов установлено, что СК не обладает способностью генерировать кислородные радикалы, но уже небольшая добавка ее к Пг человека в концентрации, достаточной для быстрой активации Пг — 0,2 моль на 1 моль Пг [13], существенно подавляла хемилюминесценцию (рис. 3). Дальнейшее увеличение концентрации СК в системе уже в меньшей степени отражалось на хемилюминесценции.

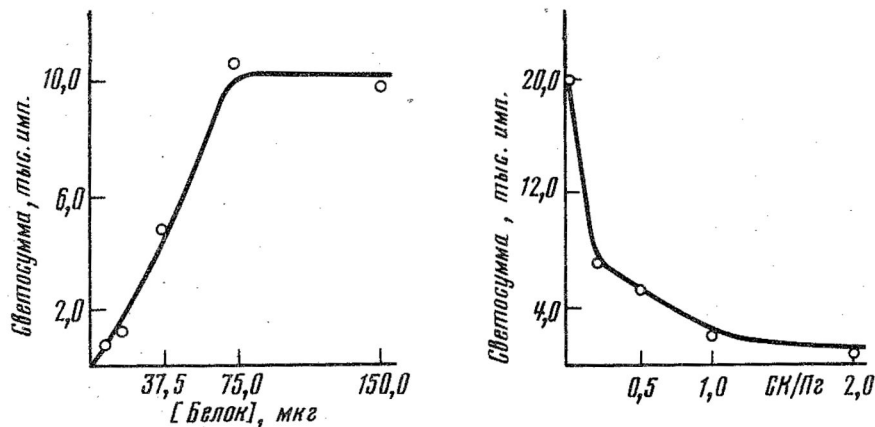


Рис. 2. Зависимость светосуммы хемилюминесценции в системе люминол — H_2O_2 от концентрации плазминогена человека

Рис. 3. Светосумма хемилюминесценции в системе люминол — H_2O_2 при различном молярном соотношении стрептокиназы и плазминогена человека. Время предынкубации стрептокиназы с плазминогеном перед добавкой H_2O_2 — 3 мин.

Это позволяет полагать, что указанный эффект связан не с внесением в систему белка, а со специфическим действием СК.

Исследование 5 образцов Пг человека, 5 образцов Пг быка и 4 образцов Пг кролика (каждый образец получен отдельно в разное время и из разных партий сырья) показало, что все препараты Пг человека и кролика обладали выраженной способностью индуцировать образование из перекиси водорода кислородных радикалов, тогда как активность Пг быка не превышала в среднем 10% таковой Пг человека (рис. 1).

Итак, плазминоген человека способен разлагать перекись водорода по радикальному механизму. Эта способность обусловлена присутствием в молекуле плазминогена металла с переменной валентностью. Она проявляется и у Пг кролика, который так же, как и человеческий Пг, активируется стрептокиназой, но очень слабо выражена у Пг быка. Генерация активных форм кислорода плазминогеном человека подавляется добавками стрептокиназы, что, по-видимому, обусловлено связыванием радикалов стрептокиназой. Изложенные материалы дают основания заключить, что в организме между компонентами фибринолитической системы, а также механизмами образования и превращения перекисей вероятно существование взаимосвязи. Это может являться одним из путей регуляции фибринолиза окислительно-восстановительными реакциями организма.

Авторы выражают благодарность Н.С. Пыжовой и Н.В. Демидчик за помощь при выделении образцов стрептокиназы и плазминогена, З.Д. Федоровой — за любезно предоставленный препарат урокиназы, С.Н. Черенкевичу — за предоставленную возможность работы на регистрирующей хемилюминесценцию установке, В.Л. Калеру — за ценные замечания.

ЛИТЕРАТУРА

1. Мищенко В.П. В кн.: Актуальные проблемы гемостазиологии. М.: Наука, 1981, с. 153.
2. Вальчихина М.Д., Миргородская О.А., Москвичев Б.В. В кн.: Иммуобилизованные ферменты в медицине и медицинской промышленности. Сб.: науч. статей. Л., 1982, с. 100.
3. Демидчик Н.В. В кн.: Стрептокиназа в регуляции свертывающей и противосвертывающей систем крови. Сб. научных работ. Минск, 1985, с. 109.
4. Такач Б. В кн.: Методы исследований в иммунологии. М.: Мир, 1981, с. 95.
5. Robbins K.C., Summaria L. In: Methods Enzymol. N.Y.; L., 1970, vol. 19, p. 184.
6. Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L., Randall R. — J. Biol. Chem., 1951, vol. 193, № 1, p. 265.
7. Ткач В.М., Пленина Л.В., Карезо Н.В. и др. В кн.: Энзимология тромбозиса и стрептокиназа. Матер. республ. симпозиума. Минск, 1982, с. 86.
8. Девени Т., Гергей Я. Аминокислоты, пептиды, белки. М.: Мир, 1976.
9. Mozen M.M. In: Thrombosis and bleeding disorders. Theory and methods. Stutt.; N.Y.; L., 1971, p. 376.
10. Андреевко Г.В., Карабасова М.А., Лютова Л.В. и др. Методы исследования фибринолитической системы крови. М.: Изд-во МГУ, 1981.
11. Говорун А.К., Левин В.И., Свирновский А.И. и др. — Биофизика, 1974, т. 19, № 1, с. 100.
12. Рокицкий П.Ф. Биологическая статистика. Минск: Высшая школа, 1973.
13. Tomar K.H., Taylor F.B. — Biochem. J., 1971, vol. 125, № 3, p. 793.