

УДК 577.151.57:577.121.7:576.34

Н. С. ПЫЖОВА, В. Н. НИКАНДРОВ

**ЗНАЧЕНИЕ ОКИСЛИТЕЛЬНО-ВОССТАНОВИТЕЛЬНЫХ РЕАКЦИЙ
В АКТИВАЦИИ ПЛАЗМИНОГЕНА СУБКЛЕТОЧНЫМИ
ФРАКЦИЯМИ ГОЛОВНОГО МОЗГА И ПЕЧЕНИ***(Представлено академиком О. А. Стрельчонком)*

Изучение действия стрептокиназы или источников активных форм кислорода на очищенные образцы плазминогена позволило выдвинуть концепцию кислородзависимого пути активации зимогена, реализующейся при участии таких форм (особенно $O_2^{\cdot -}$) и в отсутствие активаторов протеиназной природы [1, 2].

В настоящей работе нами предпринята попытка выяснить возможность реализации данного пути при участии редокс-систем субклеточных фракций гомогенатов головного мозга и печени мышей.

Фракции «ядерную», «тяжелых мембран», «митохондриальную» выделяли дифференциальным центрифугированием при 0–4 °С и факторе разделения 10000, 160000 и 500000 g · мин соответственно [3] из 10%-ных гомогенатов на 0,25 М растворе сахарозы рН 7,0 головного мозга и печени мышей линии СВА. Осадки субклеточных фракций промывали раствором сахарозы и суспендировали в 0,06 М фосфатном буфере рН 7,4. Собственную протеолитическую активность и плазминоген-активаторную способность определяли методом лизиса фибриновых пластин. Активацию связанного (т. е. прочно сорбированного фибрином) плазминогена исследовали на зимоген-содержащих (нативных) пластинах, активацию растворимого плазминогена или протеолитическую активность — на пластинах, предварительно УФ-облученных для инактивации содержащегося в фибрине зимогена. Образцы плазминогена получали методом аффинной хроматографии. Методы выделения его, оценки гомогенности и активности, характеристика использованных образцов, определения плазминоген-активаторной и фибринолитической активности подробно изложены в [4, 5]. Все исследования выполнены не менее пяти раз, результаты обработаны статистически с вычислением *t*-критерия Стьюдента.

В работе использовали стрептокиназу «Streptase» (Behringwerke AG, Германия); *p*-хлормеркурибензоат (PCMB), KCN, D-маннит, *p*-нитротетразолиевый синий (NBT) (Chemapol, Чешская Республика); L-гистидин, L-лизин, DL-метионин, реагенты для электрофореза в полиакриламидном геле, NADH (Reanal, Венгрия); Cu,Zn-супероксиддисмутазу (SOD) (Sigma, США); NaN_3 , формиат натрия, 2,6-дихлорфенолиндофенол (DCIP) (Serva, Германия); BrCN-сефарозу (Pharmacia, Швеция). Остальные реактивы производства стран СНГ подвергали дополнительной очистке.

При рН 7,4 выделенные субклеточные фракции не обладали собственной фибринолитической активностью. Это может быть следствием

неоптимальных условий анализа (рН, субстрат) или (и) латентного состояния энзимов.

Добавка стрептокиназы вызвала появление фибринолитической активности у фракций тяжелых мембран мозга ($218 \pm 15 \text{ мм}^2$) и ядерной печени ($729 \pm 40 \text{ мм}^2$), что, по-видимому, указывает на присутствие в них эндогенного плазминогена. Синтез его зафиксирован в печени [6], данных о наличии в ткани головного мозга в литературе мы не обнаружили. Учитывая характер исследуемого объекта, сосудистое происхождение зимогена маловероятно. Необычность ситуации также и в том, что зимоген мышей, по крайней мере растворимый, плохо активируется стрептокиназой [7]. По-видимому, сорбция его на мембранах изменяет конформацию белка и, как следствие, функциональные свойства.

Все субклеточные фракции активировали связанный (табл. 1) и растворимый (табл. 2) зимоген. В гепатоцитах специфический активатор плазминогена (билокиназа) обнаружен вне ядер клеток [8]. Присутствие тканевого активатора плазминогена найдено во фракциях плазматических мембран, комплекса Гольджи, лизосом [9].

Таблица 1. Особенности активации связанного плазминогена человека (мм^2 зон фибринолиза) фракциями гомогената головного мозга и печени мышей при добавках NADH, метаболических ядов и перехватчиков активных форм кислорода

Исследуемый эффектор	Фракция гомогената					
	ядерная	митохондриальная	тяжелых мембран	ядерная	митохондриальная	тяжелых мембран
	без NADH			с NADH ($7 \cdot 10^{-3} \text{ М}$)		
	<i>Головной мозг (n = 6)</i>					
Контроль	69 ± 4	105 ± 6	95 ± 4	100 ± 5	115 ± 7	125 ± 6
+ РСМВ, 0,001 М	51 ± 2*	82 ± 4*	67 ± 4*	69 ± 4*	101 ± 4	103 ± 5*
+ KCN, 0,001 М	69 ± 6	103 ± 8	96 ± 6	93 ± 7	115 ± 7	123 ± 10
+ арсенит, 0,001 М	75 ± 5	108 ± 3	88 ± 9	94 ± 6	113 ± 3	123 ± 7
+ DCIP, 0,001 М	49 ± 6*	57 ± 5*	59 ± 6*	75 ± 7*	65 ± 5*	66 ± 6*
+ гистидин, 0,1 М	87 ± 5*	110 ± 7	95 ± 3	98 ± 3	115 ± 9	148 ± 7
+ метионин, 0,1 М	73 ± 7	105 ± 10	90 ± 5	103 ± 5	113 ± 4	130 ± 8
+ NaN_3 , 0,1 М	75 ± 2	113 ± 4	95 ± 5	105 ± 4	111 ± 5	133 ± 8
+ формиат, 0,1 М	73 ± 4	100 ± 8	94 ± 7	105 ± 7	119 ± 5	125 ± 12
+ маннит, 0,1 М	75 ± 5	107 ± 6	91 ± 3	100 ± 7	115 ± 4	121 ± 3
+ NBT, 0,01 М	59 ± 3	92 ± 6	74 ± 4*	62 ± 6*	65 ± 3*	73 ± 8*
+ SOD, 500 ед.	81 ± 5	112 ± 5	100 ± 9	89 ± 7	79 ± 4*	116 ± 7
	<i>Печень (n = 7)</i>					
Контроль	82 ± 3	78 ± 4	64 ± 4	111 ± 3	87 ± 4	62 ± 2
+ РСМВ, 0,001 М	105 ± 4*	72 ± 2	41 ± 2*	—	70 ± 2*	0*
+ KCN, 0,001 М	103 ± 4*	81 ± 2	58 ± 2	—	80 ± 5	315 ± 18*
+ арсенит, 0,001 М	117 ± 5*	75 ± 5	56 ± 3	—	78 ± 7	315 ± 23*
+ DCIP, 0,001 М	100 ± 4*	71 ± 8	52 ± 4	—	70 ± 9	315 ± 14*
+ гистидин, 0,1 М	99 ± 4*	85 ± 6	82 ± 3*	—	—	—
+ метионин, 0,1 М	77 ± 3	89 ± 4	70 ± 5	—	—	—
+ NaN_3 , 0,1 М	109 ± 6*	88 ± 5	74 ± 2	—	91 ± 6	71 ± 9
+ формиат, 0,1 М	82 ± 2	75 ± 5	82 ± 4*	—	—	—
+ маннит, 0,1 М	80 ± 4	76 ± 3	70 ± 6	—	96 ± 3	246 ± 11*
+ NBT, 0,01 М	66 ± 3*	65 ± 3	47 ± 1*	—	58 ± 3*	44 ± 2*
+ SOD, 500 ед.	59 ± 4*	87 ± 5	52 ± 3*	—	—	—

Примечание. Здесь и в табл. 2 * $P \leq 0,05$, прочерк — не исследовали.

Т а б л и ц а 2. Активация растворимого плазминогена человека (mm^2 зон фибринолиза) фракциями гомогената головного мозга и печени мышей при добавках NADH и различных эффекторов

Исследуемый эффектор	Фракция гомогената					
	ядерная	митохондри- альная	тяжелых мембран	ядерная	митохондри- альная	тяжелых мембран
	без NADH			с NADH ($7 \cdot 10^{-3}$ М)		
<i>Головной мозг (n = 6)</i>						
Плазминоген	22 ± 4	22 ± 4	22 ± 4	22 ± 4	22 ± 4	22 ± 4
Плазминоген + суб- клеточные частицы (контроль)	41 ± 3	32 ± 2	33 ± 3	59 ± 2	43 ± 2	44 ± 3
+ РСМВ, 0,001 М	38 ± 4	26 ± 1	30 ± 2	46 ± 1*	35 ± 2*	32 ± 1*
+ KCN, 0,001 М	34 ± 3	32 ± 4	31 ± 4	50 ± 4	38 ± 4	34 ± 1*
+ арсенит, 0,001 М	39 ± 2	30 ± 4	30 ± 1	48 ± 4	36 ± 3	38 ± 2
+ DCIP, 0,001 М	12 ± 2*	11 ± 0*	14 ± 2*	38 ± 2*	22 ± 1*	25 ± 2*
+ гистидин, 0,1 М	61 ± 4*	33 ± 3	57 ± 3*	59 ± 0	48 ± 4	46 ± 3
+ метионин, 0,1 М	32 ± 2*	33 ± 4	35 ± 4	59 ± 4	39 ± 4	44 ± 5
+ NaN_3 , 0,1 М	66 ± 5*	46 ± 5*	58 ± 2*	66 ± 3	51 ± 3	49 ± 4
+ формиат, 0,1 М	35 ± 4	28 ± 1	46 ± 1*	53 ± 2	36 ± 3	45 ± 2
+ маннит, 0,1 М	33 ± 2*	29 ± 2	33 ± 1	47 ± 2*	38 ± 2	40 ± 1
+ NBT, 0,01 М	12 ± 3*	13 ± 1*	12 ± 0*	32 ± 2*	26 ± 1*	35 ± 1*
+ SOD, 500 ед.	30 ± 2*	27 ± 2	27 ± 2	33 ± 1*	27 ± 1*	44 ± 2
<i>Печень (n = 7)</i>						
Плазминоген	11 ± 1	11 ± 1	11 ± 1	11 ± 1	11 ± 1	11 ± 1
Плазминоген + суб- клеточные частицы (контроль)	89 ± 5	58 ± 3	102 ± 6	119 ± 5	74 ± 4	173 ± 8
+ РСМВ, 0,001 М	34 ± 2*	63 ± 6	67 ± 3*	64 ± 6*	115 ± 8*	100 ± 6*
+ KCN, 0,001 М	56 ± 4*	145 ± 11*	68 ± 3*	237 ± 8*	185 ± 11*	111 ± 5*
+ арсенит, 0,001 М	76 ± 8	133 ± 9*	67 ± 3*	237 ± 17*	90 ± 5*	99 ± 3*
+ DCIP, 0,001 М	89 ± 7	140 ± 8*	67 ± 2*	237 ± 10*	185 ± 9*	152 ± 6
+ гистидин, 0,1 М	204 ± 10*	117 ± 12*	58 ± 4*	—	—	—
+ метионин, 0,1 М	96 ± 5	57 ± 0	48 ± 2*	—	—	—
+ NaN_3 , 0,1 М	199 ± 7*	134 ± 8*	73 ± 3*	55 ± 3*	109 ± 6*	176 ± 11
+ формиат, 0,1 М	89 ± 3	61 ± 3	57 ± 5*	—	—	—
+ маннит, 0,1 М	89 ± 8	38 ± 4*	45 ± 2*	152 ± 10*	110 ± 7*	176 ± 10
+ NBT, 0,01 М	0*	32 ± 3*	10 ± 1*	16 ± 2*	103 ± 6*	232 ± 10*
+ SOD, 500 ед.	64 ± 4*	52 ± 5	41 ± 3*	—	—	—

Плазминоген-активаторная способность (по связанному зимогену) фракций гомогената мозга умеренно угнеталась РСМВ и сильно — DCIP (табл. 1). Мы установили, что в концентрации 10^{-6} — 10^{-3} М РСМВ, KCN, арсенит натрия, DCIP на активность плазмина не влияли. Поэтому наблюдаемый эффект — результат действия соединений именно на активацию зимогена. Поскольку его протеиназные активаторы — тканевый, урокиназа — к РСМВ нечувствительны (собственные наблюдения, а также [10]), а данных литературы о возможности активации зимогена Cys-протеиназами нет, можно думать, что РСМВ и DCIP

воздействуют на его активацию через редокс-процессы. Перехватчики активных форм кислорода изменяли плазминоген-активаторную функцию фракций ядерной (стимулировалась гистидином) и тяжелых мембран (угнеталась NBT), но не митохондриальной (табл. 1). Плазмин, образуемый при активации связанного зимогена, слабо чувствителен к перехватчикам [5]. Поэтому эти небольшие эффекты, на наш взгляд, сопряжены с модификацией именно процесса активации плазминогена.

Добавки NADH умеренно усиливали активацию связанного зимогена фракциями гомогенатов мозга, за исключением митохондриальной. Нуклеотид принципиально не менял действие метаболических ядов и DCIP. Поэтому если ингибирование DCIP связано с шунтированием электрон-транспортной цепи, то оно, учитывая E_B^0 , происходит на участке «цитохром $b - Fe-S$ центр». В отдельных опытах мы установили, что NADH в концентрации $10^{-3} - 2 \cdot 10^{-2}$ М не меняет активность плазмينا. На фоне добавок нуклеотида резко усиливалось ингибирование NBT активации плазминогена субклеточными фракциями. Ингибирование проявлялось даже в опытах с митохондриальной фракцией, причем плазминоген-активаторная функция ее ингибировалась даже SOD. Известно, что в митохондриях максимальный уровень $O_2^{\cdot -}$ образуется как раз при движении восстановительных эквивалентов через участок «коэнзим Q—цитохром b_{566} » [11].

«Нагрузка» выделенных мембранных фракций мозга растворимым плазминогеном делала его активацию малочувствительной к РСМВ (за исключением митохондрий), но не к DCIP. Возможно, связывание зимогена с мембранами экранирует их SH-содержащие сайты. Активация зимогена угнеталась перехватчиками $O_2^{\cdot -}$, в отдельных случаях модифицировалась перехватчиками $\cdot OH$ или $O_2^{\Delta 1}$, хотя растворимый плазмин нечувствителен к гистидину, манниту, формиату, активировался азидом лишь на 16% и полностью блокировался NBT, а на активаторную функцию урокиназы эти перехватчики не влияли [5]. Эти эффекты согласуются с генерированием $O_2^{\cdot -}$ митохондриями [11]. Добавки NADH повышали фибринолитическую активность (как и в опытах со связанным зимогеном) образцов плазминогена в присутствии всех фракций гомогенатов мозга. В этом случае ингибирование РСМВ, как правило, усиливалось, появлялась тенденция к ингибирующему действию у KCN, арсенита, ингибиторное действие NBT снижалось.

Плазминоген-активаторная способность ядерной фракции печени умеренно возрастала под действием всех метаболических ядов и DCIP; активаторная способность митохондриальной фракции была к ним индифферентна (в отличие от фракции мозга), а тяжелых мембран подавлялась РСМВ и DCIP (табл. 1). Активация зимогена фракциями ядерной и тяжелых мембран снижалась всеми перехватчиками $O_2^{\cdot -}$, усиливалась гистидином и азидом. Судя по действию РСМВ, активаторная функция ядерной фракции независима от Cys-протеиназ; генерирование $O_2^{\cdot -}$ в этой фракции может идти по цианид-резистентным путям.

Добавки NADH в отличие от мозга не меняли активаторную способность фракции тяжелых мембран печени. Но в этой ситуации РСМВ полностью блокировал, а цианид, арсенит и DCIP резко усиливали активацию плазминогена. Этот же эффект был характерен для маннита.

Реакция митохондриальной фракции печени на метаболические яды и перехватчики в присутствии NADH была аналогична реакции мозга. Изменения же плазминоген-активаторной функции ядерной фракции ядами и перехватчиками после добавок NADH были столь полиморфны и имели такой разброс, что оказалось невозможно составить определенную картину. Здесь требуется проведение отдельных экспериментов с дополнительным фракционированием ядерной фракции.

«Нагрузка» растворимым плазминогеном фракций печени заметно меняла действие DCIP и метаболических ядов, особенно в опытах с ядерной и митохондриальной фракциями (табл. 2). Как и в опытах с фракциями гомогенатов мозга активация зимогена сильно угнеталась NBT, SOD (особенно у тяжелых мембран). Принципиальным отличием от фракций гомогенатов мозга были подавление активаторной способности тяжелых мембран перехватчиками $O_2^{\Delta_1}$ и OH, умеренное снижение таковой в митохондриальной фракции маннитом и сильная активация гистидином.

Добавки NADH повышали активацию растворимого плазминогена фракциями печени. Они слабо изменяли действие DCIP и ядов на активацию, вызванную тяжелыми мембранами, митохондриальной фракцией, но усиливали (кроме РСМВ) ее в присутствии ядерной. Ингибирование NBT заметно уменьшалось, а в экспериментах с фракциями тяжелых мембран и митохондриальной сменялось потенцированием. Объяснение этого неожиданного эффекта требует проведения дальнейших углубленных исследований.

Несмотря на многоплановость полученных фактов, можно выделить следующие основные моменты. Впервые показано, что акцептор электронов — DCIP и метаболические яды изменяют плазминоген-активаторную способность субклеточных фракций тканей. NADH вызывает рост этой способности, но не во всех случаях. Это вполне объяснимо, учитывая метаболическую специфику тканей и ограничения проницаемости биомембран для NADH. Присутствие нуклеотида модифицирует действие DCIP, ядов, перехватчиков активных форм кислорода. Сопоставление полученных материалов и данных литературы позволяет считать, что, во всяком случае, одной из причин активации плазминогена субклеточными фракциями тканей в модельных условиях были редокс-реакции, продуцирующие активные формы кислорода. Это подтверждается эффектом перехватчиков последних, например, $O_2^{\dot{-}}$. Соотношение протеиназного и кислородзависимого механизмов активации зимогена зависит от метаболической специфики тканей. Дальнейшие исследования целесообразны с использованием субстрата окисления, достаточно легко проникающего через мембраны. Приведенные материалы получены на модели активации экзогенного чужеродного для тканей мышей зимогена. Они впервые показывают принципиальную возможность активации по кислородзависимому пути собственных тканевых зимогенов сериновых протеиназ. Мы полагаем, что демонстрация такой возможности — вопрос времени. Обнаруженные в ходе исследований частные новые факты: наличие плазминогена в ткани мозга, активация плазминогена мышью стрептокиназой, усиление процесса его активации в присутствии NBT — довольно необычны. Раскрытие их сущности составляет предмет дальнейших исследований.

Исследования финансировались Фондом фундаментальных исследований Республики Беларусь.

Summary

A plasminogen-activating ability of mouse brain and liver «nuclear», «mitochondrial» and «heavy membranes» fractions is modified by metabolic poisons (0.001 M), 2,6-dichlorophenolindophenol, NADH (0.007 M) and active oxygen species scavengers. NADH presence changes the character of above mentioned compounds influence. It has been concluded, that one of the causes of the indicated ability is redox-reactions, which produce an active oxygen species.

Литература

1. Nikandrov V. N., Pyzhova N. S. // Folia Haematol. 1988. Vol. 115. P. 557—564.
2. Nikandrov V. N. // Int. J. Biochem. 1992. Vol. 24. P. 47—53.
3. Поздняков С. П., Соловьева В. Н., Дмитровский А. А. // Прикл. биохим. микробиология. 1979. Т. 15. С. 454—457.
4. Nikandrov V. N., Vorobyova G. V., Yankovskaya G. S., Demidchik N. V. // Int. J. Biol. Macromol. 1992. Vol. 14. P. 229—234.
5. Pyzhova N. S., Nikandrov V. N., Nikandrov N. N. // Thromb. Res. 1996. Vol. 82. P. 303—312.
6. Raum D., Markus D., Alper Ch. A. et al. // Science. 1980. Vol. 208. P. 1036—1037.
7. Wulf R. Y., Mertz E. T. // Can. J. Biochem. 1969. Vol. 47. P. 927—931.
8. Ariga T., Oshiba S., Seki T. et al. // Thromb. Res. 1989. Vol. 56. P. 37—48.
9. Егоров Б. Б., Стрижаченко Н. М. Итоги науки и техники. Общие проблемы физико-химической биологии. Т. 14. Синтез и секреция активаторов плазминогена различными клеточными системами. М., 1988.
10. Kobayashi O., Matsui K., Minamiura N., Yamamoto T. // J. Biochem. 1985. Vol. 97. P. 37—44.
11. Nohl H., Jordan W. // Biochem. biophys. res. commun. 1986. Vol. 138. P. 533—539.

НИИ эпидемиологии и микробиологии
Минздрава Республики Беларусь

Поступило 10.09.97