

**ДОКЛАДЫ**  
**АКАДЕМИИ НАУК БССР**

ТОМ XXXI

4

1987

УДК 577.15:541.515 :546.21

В. Н. НИКАНДРОВ, Н. С. ПЫЖОВА,  
академик АМН СССР В. И. ВОТЯКОВ, Ю. Е. КЛИНГЕР

## РОЛЬ СУПЕРОКСИДНОГО РАДИКАЛА В РЕАЛИЗАЦИИ АКТИВАТОРНОЙ ФУНКЦИИ СТРЕПТОКИНАЗЫ

Одним из наиболее эффективных активаторов пламиногена человека является синтезируемый  $\beta$ -гемолитическими стрептококками белок — стрептокиназа (СК). Механизм активации пламиногена СК до сих пор остается непонятным, а имеющиеся гипотезы не являются достаточными для объяснения этого механизма [1]. Известный факт увеличения уровня фибринолиза в организме при гипербарической оксигенации [2] позволил нам предположить, что функция СК обусловлена участием кислородных радикалов.

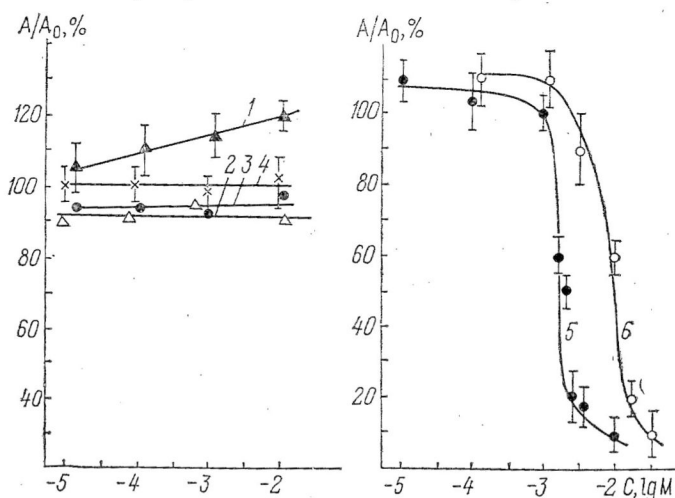
Образцы СК выделяли из культуральной жидкости  $\beta$ -гемолитического стрептококка штамма H46A путем сорбции на двуокиси кремния с элюцией 0,1 М раствором карбоната натрия [3], последующей ионообменной хроматографии на ДЭАЭ-целлюлозе в хлоридной форме в 0,05 М *трис*-HCl буфере pH 7,4 [4] с элюцией 0,3 М раствором NaCl, осаждением этанолом при pH 5,0 и NaCl в конечной концентрации 10% при pH 2,0. Полученные образцы были гомогенны при электрофорезе в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия [5] и имели при определении по лизису фибриновых сгустков [6] или по лизису фибриновых пластин [7] удельную активность 100—150 тыс. ME/мг белка, содержание которого учитывали по методу Лоури [8] или по абсорбции при 280 нм, используя величину  $A_{280}^{1\%} = 9,0$  [9].

В качестве активаторов пламиногена использовали также бычий трипсин фирмы «Fluka» (Швейцария), урокиназу (препарат урокинин) и  $\alpha$ -химотрипсин отечественного производства без дополнительной очистки; лонголитин — протеиназу из гриба *Arthrobothrys longa* выделяли из культуральной жидкости осаждением ацетоном и последующей гель-хроматографией на сефадексе G-100 в 0,06 М фосфатном буфере pH 7,4, степень очистки образцов лонголитина составляла 100. Частично очищенные образцы тканевого активатора пламиногена выделены из свежего сердца свиньи экстракцией 0,1 н. HCl с последующим фракционированием сульфатом аммония [10].

Активаторную способность учитывали методом лизиса фибриновых пластин, содержащих человеческий пламиноген [7]. Пластины готовили в чашках Петри на строго горизонтальной поверхности, смешивая из расчета на 1 пластину 9,0 мл раствора, содержащего пламиноген фибриногена человека (3 мг белка/мл), 0,2 мл раствора тромбина (100 ед/мл). Белки растворяли в 0,06 М фосфатном буфере pH 7,4. На поверхность пластин или в вырезанные в них лунки вносили по 30 мкл исследуемых растворов, пластины инкубировали на строго горизонтальной поверхности при 37 °C в течение 20 ч и учитывали площадь зон лизиса. Колебания активности в параллельных определениях не превы-

шали 7%. Все исследования выполнены не менее чем четырехкратно, результаты обработаны статистически [11].

В работе использованы также азид натрия («Serva», ФРГ), сефадекс G-100 («Pharmacia», Швеция), ДЭАЭ-целлюлоза, этилендиаминтетраацетат натрия (ЭДТА), L-триптофан, L-гистидин, м-нитросиний тетразолий (НСТ) фирмы «Reanal» (Венгрия), L-адреналин-D-гидротартрат («Fluka»), D-маннит («Хемапол», ЧССР). Содержащий плазминоген фибриноген человека и тромбин человека были отечественного



производства, как и остальные реактивы, которые подвергались дополнительной очистке.

Добавление к раствору СК маннита — перехватчика  $\text{OH}\cdot$  радикала,

Рис. 1. Влияние добавок к раствору стрептокиназы азид натрия (1), L-гистидина (2), L-триптофана (3), D-маннита (4), нитросинего тетразолия (5) и адреналина (6) на ее активаторную функцию (% к контролю, принятому за 100%)

L-гистидина или L-триптофана — перехватчиков синглетного кислорода не влияло на активаторную функцию СК (рис. 1). Более эффективный перехватчик синглетного кислорода — азид натрия несколько увеличил активность СК. Вместе с тем внесение в раствор СК перехватчиков супероксидного радикала — НСТ или адреналина резко тормозило активаторную функцию СК (рис. 1), причем ингибирующее действие этих соединений напоминало, судя по характеру кривых, кооперативный процесс. Ингибирующее действие НСТ и адреналина на активаторную функцию СК в столь высоких концентрациях может объясняться различиями сродства супероксидного радикала к системе СК — плазминоген и к специфическим перехватчикам.

Обнаруженный факт подтвердил наше предположение о связи механизма активации плазминогена СК с кислородными радикалами. Исследование влияния НСТ в концентрации  $10^{-2}$  М на активаторные свойства урокиназы, трипсина,  $\alpha$ -химотрипсина, лонголитина и тканевого

Таблица 1. Влияние нитросинего тетразолия в конечной концентрации  $10^{-2}$  М на лизис фибриновых пластин, содержащих плазминоген человека, под действием различных активаторов плазминогена и протеиназ ( $n=6$ )

Ферменты	Площадь зон лизиса, мм <sup>2</sup>		Подавление активности, %	Ферменты	Площадь зон лизиса, мм <sup>2</sup>		Подавление активности, %
	без добавки НСТ	с добавкой НСТ			без добавки НСТ	с добавкой НСТ	
Стрептокиназа, 1500 МЕ	434 ± 12	43 ± 2*	90,0	$\alpha$ -Химотрипсин, 60 мкг	492 ± 15	478 ± 14	2,9
Урокиназа, 1500 ед.	525 ± 12	500 ± 13	4,8	Лонголитин, 0,6 мкг	193 ± 4	186 ± 4	3,5
Трипсин, 129 ед.	519 ± 36	488 ± 34	6,0	Тканевый активатор из сердца свиньи	200 ± 10	175 ± 12	12,5

\* Изменения достоверные по отношению к контролю при  $P \leq 0,05$  (то же см. табл. 2).



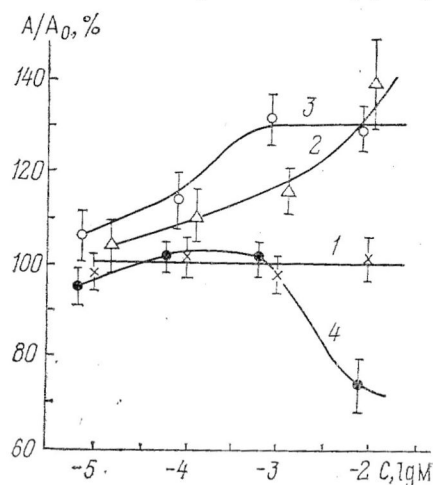
Таблица 2. Влияние некоторых хелатирующих агентов в конечной концентрации  $10^{-2}M$  на активаторную функцию стрептокиназы (по лизису фибриновых пластин) после обработки ее мочевиной или диметилсульфоксидом ( $n=5$ )

Вариант опыта	Площадь зон лизиса, мм <sup>2</sup>	% к контролю
СК + фосфатный буфер (контроль)	465 ± 6,5	100
СК + ЭДТА	349 ± 9,8*	75
СК + диэтилдитиокарбамат натрия	581 ± 15,6*	125
СК + <i>o</i> -фенантролин	558 ± 14,1*	120
СК + 8-оксихинолин	507 ± 27,2	109
СК + мочевины, 4 М	492 ± 21,0	106
СК + мочевины, 4 М + ЭДТА	386 ± 30,4*	83
СК + мочевины, 4 М + диэтилдитиокарбамат натрия	521 ± 14,1*	112
СК + мочевины, 4 М + <i>o</i> -фенантролин	558 ± 10,0*	120
СК + мочевины, 4 М + 8-оксихинолин	507 ± 30,4	109
СК + ДМСО, 80%	437 ± 14,1	94
СК + ДМСО, 80% + ЭДТА	256 ± 20,0*	55
СК + ДМСО, 80% + диэтилдитиокарбамат натрия	391 ± 10*	84
СК + ДМСО, 80% + <i>o</i> -фенантролин	326 ± 13*	70
СК + ДМСО, 80% + 8-оксихинолин	391 ± 20*	84

активатора плазминогена показало, что эти активаторы в отличие от СК практически нечувствительны к действию НСТ (табл. 1). Следовательно, лишь при активации плазминогена СК имеет место участие супероксидного радикала. Более того, отсутствие эффекта НСТ на иницируемый урокиназой или тканевым активатором фибринолиз свидетельствует о том, что супероксидные радикалы имеют отношение именно к процессу активации плазминогена СК, а не к лизису фибрина плазмином.

Поскольку образование и конверсия супероксидных радикалов чаще всего обусловлены наличием в системе функционально значимых металлов переменной валентности, мы исследовали влияние на активаторную функцию СК некоторых хелатирующих агентов. Оказалось, что 8-оксихинолин на активность СК не влиял, а *o*-фенантролин и диэтилдитиокарбамат вызвали ее заметное увеличение (рис. 2). Такое влияние указанных соединений могло быть обусловлено тем, что они связывали имеющиеся в виде примесей ионы переходных металлов, которые способны значительно угнетать иницируемый СК фибринолиз [12]. Это допущение, однако, не согласуется с тем, что внесение в раствор СК ЭДТА вызывает умеренное снижение иницированного СК фибринолиза (рис. 2). Кроме того, в случае железосерных белков *o*-фенантролин способен вызывать усиление функции (перекисного окисления липидов, разложения гидроперекисей), а не ее подавление [13]. Сопоставление этих фактов с материалами о высокой функциональной устойчивости СК даже при нарушении третичной и вторичной структуры белка [12, 14] позволило предположить, что если СК имеет функционально значимые металлы, то они, по всей видимости, трудно достигаемы при различных воздействиях. Во всяком случае медь в цитохромоксидазе не реагирует даже с очень сильными хелатирующими агентами [15].

Рис. 2. Изменения активаторной функции стрептокиназы (% к контролю, принятому за 100%) под действием 8-оксихинолина (1), диэтилдитиокарбамата натрия (2), *o*-фенантролина (3) или ЭДТА (4)



Для проверки этого предположения мы изучили действие различных хелатирующих агентов на активаторную функцию СК, структура которой лабильна добавлением 4 М мочевины или 80% ДМСО (диметилсульфоксид). Оказалось, что предварительное воздействие на СК мочевины не меняло характер действия комплексонов (табл. 2), а обработка СК ДМСО усиливала ингибирующий эффект ЭДТА, вызвала угнетения СК (вместо активации) диэтилдитиокарбаматом или *o*-фенантролином. Эти данные позволяют думать, что молекула СК может содержать металл переменной валентности, с которым, возможно, связана ее функциональная активность.

На основании изложенных материалов можно полагать, что активация плазминогена СК — процесс, специфически связанный с образованием и конверсией супероксидных радикалов. Это принципиально отличает индуцируемый СК процесс от действия других активаторов плазминогена протеиназного типа. Можно также предположить, что такая специфика действия СК связана с присутствием в ее молекуле металла переменной валентности. Полученные данные дают основания полагать, что активаторная функция СК в отношении плазминогена является, возможно, лишь частным выражением функциональной специфики СК. Все перечисленное позволяет также взглянуть на СК как на «инструмент», выполняющий определенную и, по-видимому, немаловажную роль в энергетическом обмене продуцента.

### Summary

The scavengers of superoxide radicals, nitro blue tetrazolium or adrenaline at final concentrations of  $5 \cdot 10^{-3}$ — $10^{-2}$  M inhibit the activating function of streptokinase. The addition of the complexing agents (8-hydroxyquinoline, sodium diethyldithiocarbamate, *o*-phenanthroline and EDTA) to streptokinase solution changes its activating function depending on the type of the agent and the conformational state of the protein molecule. It is concluded that superoxide radicals participate in the activating function of streptokinase and metals with variable valence are present in its molecule.

### Литература

1. Никандров В. Н. // Энзимология тромболитизиса и стрептокиназа. Минск, 1982. С. 23—34.
2. Андреев Г. В. Фибринолиз. Биохимия, физиология и патология. М., 1979. 325 с.
3. Такач В. М., Карезо Н. В., Постоянова Н. И. и др. // Энзимология тромболитизиса и стрептокиназа. Минск, 1982. С. 86—89.
4. Девени Т., Гергей Я. Аминокислоты, пептиды, белки. М., 1976. 364 с.
5. Такач Б. // Методы исследования в иммунологии. М., 1981. С. 95—119.
6. Moez M. M. // Thrombosis and Bleeding Disorders. Theory and Methods. Stutt.; New York; London, 1976. P. 376—379.
7. Андреев Г. В., Карабасова М. А., Лютова Л. В. и др. Методы исследования фибринолитической системы крови. М., 1981. 132 с.
8. Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., Randall R. // J. Biol. Chem. 1951. Vol. 193, N 1. P. 265—275.
9. Kirschenbaum D. M. // Anal. Biochem. 1975. Vol. 68. P. 465—484.
10. Андреев Г. В., Мигалина Л. А. // Биохимия. 1976. Т. 36, № 4. С. 685—689.
11. Рокицкий П. Ф. Биологическая статистика. Минск, 1973. 320 с.
12. Никандров В. Н., Воробьева Г. В., Пыжова Н. С. и др. // V Всесоюзный биохимический съезд: Тез. стендовых сообщений. М., 1986. Т. 2. С. 14—15.
13. Kaschnitz R. M., Hatefi Y. // Arch. Biochem. 1975. Vol. 171, N 1. P. 292.
14. Никандров В. Н., Воробьева Г. В., Янковская Г. С., Бобылев Ю. Н. // Физико-химические свойства биополимеров в растворе и клетках: Тез. докл. симпозиума. Пущино, 1985. С. 72—73.
15. Уортон Д. К. // Неорганическая биохимия. М., 1978. Т. 2. С. 397—433.

Белорусский научно-исследовательский  
институт эпидемиологии и микробиологии  
Минздрава БССР

Поступило 09.04.86