

ДОКЛАДЫ
АКАДЕМИИ НАУК БССР

ТОМ XXX

6

1986

УДК 577.15.04:546.21-121

В. Н. НИКАНДРОВ, Н. С. ПЫЖОВА, Ю. М. СУДНИК

**РОЛЬ КИСЛОРОДА СРЕДЫ В РЕАЛИЗАЦИИ
ИНИЦИИРОВАННОГО СТРЕПТОКИНАЗОЙ ФИБРИНОЛИЗА***(Представлено академиком АН БССР А. С. Дмитриевым)*

Физико-химические механизмы регуляции гемостаза и фибринолиза изучены крайне недостаточно. Недавно высказано предположение [1] о связи снижения pO_2 венозной крови с возникновением тромбозов. Установлено также, что при ингаляции кислородом или при гипербарической оксигенации в организме усиливаются фибринолитические процессы [2]. Однако причины этих явлений остаются непонятными.

Нами предположено, что концентрация кислорода в среде может оказывать прямое влияние на активацию фибринолиза. В этой связи изучено влияние изменения содержания кислорода в среде на скорость фибринолиза, инициируемого одним из наиболее эффективных белковых активаторов пламиногена — стрептокиназой, синтезируемой β -гемолитическими стрептококками.

Эксперименты приведены на системе «фибриноген—тромбин—плазминоген—стрептокиназа» при температуре $37 \pm 0,5^\circ\text{C}$. Состав инкубационной смеси: 1,0 мл раствора человеческого фибриногена, содержащего плазминоген (1 мг белка/мл); 0,1 мл раствора человеческого тромбина (40 ед/мл) и 0,1 мл раствора стрептокиназы (400 МЕ). Все белки растворяли в 0,15 М растворе хлорида натрия, рН 6,8. Скорость фибринолиза учитывали по времени растворения образующегося сгустка фибрина [3].

Концентрацию кислорода в реакционной смеси изменяли, растворяя белки на предварительно дегазированном (30 мин при разрежении 10 мм рт. ст.) 0,15 М растворе хлорида натрия, а также на растворе хлорида натрия, подвергнутом после дегазирования продувке кислородом или азотом. Кроме того, для изменения концентрации кислорода в среде фибриноген, тромбин и стрептокиназу растворяли в предварительно приготовленных растворах гидрохинона, пирокатехина или сульфата натрия в конечной концентрации 10^{-2} М.

В экспериментах использованы препараты человеческого тромбина и содержащего плазминоген человеческого фибриногена производства Белорусского НИИ переливания крови, гидрохинон и пирокатехин (катехол) фирмы «Sigma» (США). Все неорганические соли были отечественного производства марки «х. ч.», которые дополнительно очищали многократной перекристаллизацией. Стрептокиназа получена из культуральной жидкости гемолитического стрептококка методом ионообменной хроматографии [4]. Активность образцов стрептокиназы соответствовала 100 000 МЕ/мг белка. Активность стрептокиназы и содержание белка определяли, как описано нами ранее [5]. Материалы исследований обработаны статистически [6].

В результате исследований установлено, что изменение насыщенно-

Изменение скорости иницированного стрептокиназой лизиса фибринового сгустка при сдвигах концентрации кислорода в среде ($n = 6$)

Условия эксперимента	Время лизиса сгустка, мин	Условия эксперимента	Время лизиса сгустка, мин
Контроль	$8,4 \pm 0,35$	Дегазирование + гидрохинон, 10^{-2} М	$20,0 \pm 0,71^*$
Дегазирование	$14,3 \pm 0,82^*$	Пирокатехин, 10^{-2} М	$12,3 \pm 0,26^*$
Дегазирование + насыщение кислородом	$9,0 \pm 0,1$	Дегазирование + пирокатехин, 10^{-2} М	$14,8 \pm 0,73^*$
Дегазирование + насыщение азотом	$14,0 \pm 0,1^*$	Na_2SO_3 , 10^{-2} М	$20,0 \pm 0,1^*$
Гидрохинон, 10^{-2} М	$10,3 \pm 0,26^*$	Дегазирование + Na_2SO_3 , 10^{-2} М	$12,8 \pm 0,26^*$
		Na_2SO_4 , 10^{-2} М	$9,0 \pm 0,17$

* Изменения, статистически достоверные по отношению к контролю ($P < 0,05$).

сти среды кислородом заметно влияет на скорость иницированного стрептокиназой лизиса фибринового сгустка (таблица).

При использовании для растворения белков дегазированного 0,15 М раствора NaCl время иницированного стрептокиназой лизиса фибринового сгустка удлинялось в 1,7 раза. Продувка дегазированного раствора NaCl кислородом в течение 5 мин приводила к ускорению фибринолиза до величин, практически не отличимых от контроля (растворы белков приготовлены на 0,15 М растворе NaCl без предварительного дегазирования). В то же время использование азота вместо кислорода для продувки дегазированного солевого раствора не приводило к изменению скорости иницированного стрептокиназой фибринолиза в сравнении с таковой в дегазированных средах.

Введение в 0,15 М раствор хлорида натрия соединений, способствующих связыванию растворенного кислорода, — гидрохинона, пирокатехина или сульфита натрия — обусловило увеличение времени лизиса фибринового сгустка соответственно в 1,23; 1,46 и 2,40 раза. При этом предварительное дегазирование растворов резко усиливало эффект гидрохинона, в меньшей степени пирокатехина и снижало ингибирующее действие сульфита. По-видимому, описанные сдвиги отражают различия характера взаимодействия каждого из использованных соединений с кислородом в конкретной системе.

В экспериментах нам не удалось достичь полного подавления фибринолиза. При указанной температуре, нормальном атмосферном давлении концентрация растворенного кислорода в среде приближалась к $2 \cdot 10^{-3}$ М. Между тем достичь полного связывания его увеличением на один порядок концентрации гидрохинона, пирокатехина или сульфита натрия оказалось невозможным вследствие образования хлопьев белка в растворе фибриногена. Кроме того, неполное подавление фибринолиза могло быть следствием различия констант реакций связывания кислорода и его участия в активации фибринолиза.

Для подтверждения того, что достигаемый эффект обусловлен именно связыванием кислорода, а не воздействием на реакцию, например, ионной силы раствора или образования продуктов окисления, в отдельных опытах исследовано влияние на иницируемый стрептокиназой фибринолиз продукта окисления сульфита — сульфата натрия в идентичной концентрации. Результаты экспериментов свидетельствуют об отсутствии заметного влияния сульфата на изучаемый процесс (таблица).

Изложенные материалы подтверждают возможность прямого воздействия кислорода среды на процесс активации фибринолиза. Это объясняет описанные ранее эффекты сдвига гемостазиологического статуса в организме при изменении концентрации кислорода. Более того, установленные нами факты дают основание полагать возможным участие

кислорода в специфическом каталитическом акте — активации плазминогена. Учитывая, что одним из путей окисления сульфита является взаимодействие его с супероксидным радикалом [7], можно допустить, что процесс активации фибринолиза стрептокиназой идет с участием активных форм кислорода.

Авторы выражают благодарность Г. С. Давыдовой и Н. Л. Шатило за предоставленные образцы культуральной жидкости гемолитического стрептококка для выделения стрептокиназы.

Summary

Degassing of solutions, their perflation with nitrogen or addition of compounds binding the dissolved oxygen such as hydroquinone, pyrocatechol, sodium sulphite decelerate the streptokinase-induced fibrin gel lysis. It is concluded that oxygen of the medium directly influences the fibrinolysis intensity. Oxygen is supposed to participate (presumably in its active forms) in the specific catalytic process of plasminogen activation.

Литература

1. Okoye G. C., Evans J. H., Beattie J. et al.—Thromb. Haemostas., 1984, vol. 51, N 1, p. 103—104.
2. Андреев Г. В. Фибринолиз.—М.: Изд-во МГУ, 1979.—325 с.
3. Mozen M. M.—In: Thrombosis and Bleeding Disorders. Theory and Methods.—Stutt.—N. Y.—London: Acad. Press, 1971, p. 376—379.
4. Ткач В. М., Пленина Л. В., Карезо Н. В., Пыжова Н. С.—В кн.: Стрептокиназа и другие тромболитические ферменты. Мн., 1979, с. 79—85.
5. Никандров В. Н., Воробьева Г. В.—Вестн АН БССР. Сер. биол. наук, 1984, № 5, с. 74—78.
6. Рокицкий П. Ф. Биологическая статистика.—Мн.: Вышэйш. шк., 1973.—320 с.
7. Мерзляк М. Н., Соболев А. С.—В кн.: Молекулярная патология мембранных структур / Итоги науки и техники. Биофизика. М.: Изд-во ВИНТИ, 1975, т. 5, с. 118—165.

*Белорусский научно-исследовательский институт
эпидемиологии и микробиологии Минздрава БССР*

Поступило 28.08.85