

**ДОКЛАДЫ**  
**АКАДЕМИИ НАУК БССР**

1986 г. т. 30 № 11

**ТОМ XXX**

**11**

**1986**

## БИОХИМИЯ

УДК 577.158 : 577.15.02

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

ОБНАРУЖЕНИЕ СУПЕРОКСИДДИСМУТАЗНОЙ АКТИВНОСТИ  
У СРЕПТОКИНАЗЫ

Одним из наиболее эффективных активаторов плазминогена человека является стрептокиназа (СК) — синтезируемый рядом  $\beta$ -гемолитических стрептококков белок. Несмотря на то что активаторная функция СК изучается уже более 50 лет, до сих пор механизм активации плазминогена стрептокиназой остается непонятым [1]. Совокупность имеющихся в литературе данных — усиление в организме фибринолиза при гипербарической оксигенации [2], угнетение фибринолиза продуктами перекисного окисления и реактивация антиоксидантами [3], ингибирующее действие на иницируемый СК фибринолиз ионов переходных металлов [4, 5] — привела нас к допущению об участии в активации плазминогена активных форм кислорода. Причем СК в этом процессе может выполнять функцию, подобную супероксиддисмутазе (СОД;  $O_2^{\cdot-} - O_2^{\cdot-}$  — оксидоредуктаза; 1. 15. 1. 1).

В настоящей работе приводятся доказательства этого предположения.

СК выделяли непосредственно из культуральной жидкости после культивирования стрептококка штамма Н46А путем сорбции на двуокиси кремния с элюцией 0,1 М раствором карбоната натрия [6], последующей ионообменной хроматографии на ДЭАЭ-целлюлозе в хлоридной форме в 0,05 М трис-НСI буфере рН 7,4 [7] с элюцией 0,3 М раствором хлорида натрия, осаждения этанолом при рН 5,0 и хлоридом натрия в конечной концентрации 10% при рН 2,0. Исследованием образцов СК методом электрофореза в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия [8] установлена гомогенность полученных образцов. Активность СК определяли методом лизиса фибриновых сгустков и фибриновых пластин, как описано нами ранее [9], с коррекцией по международному стандарту «стрептокиназа—стрептодорназа» (Лондон, ВОЗ). Удельная активность образцов СК соответствовала 100—120 тыс. МЕ/мг белка. Концентрацию белка определяли по методу Лоури, как и в предыдущих работах [9].

Для определения супероксиддисмутазной (СОД) активности использовали две системы: рибофлавин—метионин [10] или никотинамидадениндинуклеотид восстановленный (НАДН) — феназинметосульфат (ФМС) [11]. Реакционная смесь включала при использовании 1-й системы 0,06 М фосфатный буфер рН 7,4—10мл; L-метионин—13 мМ; рибофлавин—6,5 мкМ; нитросиний тетразолий—87 мкМ; тритон X-100 в конечной концентрации 0,09% [10]. Образование супероксидных радикалов инициировали ультрафиолетовым облучением смеси лампой ДРТ-23 на расстоянии 50 см при постоянном перемешивании реакционной смеси с помощью магнитной мешалки. Скорость образования супероксидных радикалов учитывали каждые 2 мин по абсорбции при 560 нм.

При использовании 2-й системы реакционная смесь включала 0,06 М фосфатный буфер рН 7,4—4,0 мл; НАДН—234 мкМ; ФМС—8 мкМ; нитросиний тетразолий—87 мкМ. Реакцию учитывали через 2 мин.

Исследования СОД-активности выполнены при комнатной температуре и не менее чем четырехкратно. Реакцию запускали внесением в системы соответственно рибофлавина или ФМС. СК добавляли до внесения этих реагентов, о ее СОД-активности судили по степени подав-

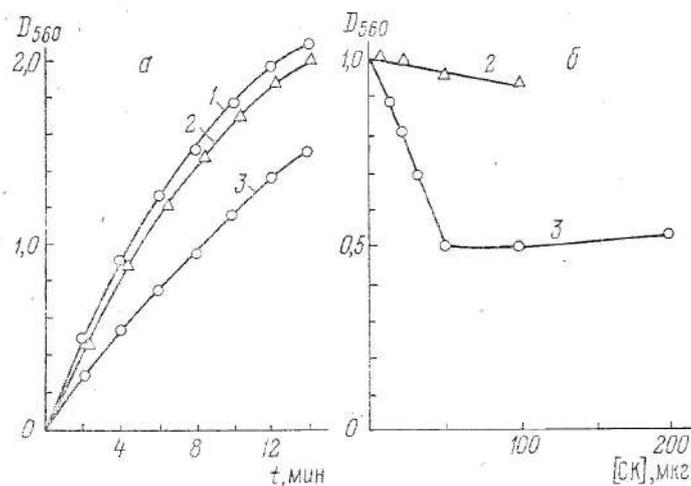


Рис. 1. Кинетика образования супероксидных радикалов в системе метионин—рибофлавин при внесении стрептокиназы и сывороточного альбумина человека (а) и влияние этих белков на образование супероксидных радикалов в системе НАДН—ФМС (б) (содержание стрептокиназы или сывороточного альбумина в пробе при использовании системы метионин—рибофлавин — 1 мг; 1 — контроль, 2 — при добавлении сывороточного альбумина, 3 — при добавлении стрептокиназы)

ния скорости восстановления нитросинего тетразолия. Результаты исследований обработаны статистически [12].

В работе использованы ФМС и тритон X-100 фирмы «Fegak», НАДН, человеческий сывороточный альбумин, рибофлавин, нитросиний тетразолий, L-метионин, ДЭАЭ-целлюлоза фирмы «Reanal». Человеческий фибриноген и тромбин, все органические соли марки «х. ч.» были отечественного производства, их использовали после дополнительной очистки перекристаллизацией.

Внесение СК в системы генерации супероксидных радикалов приводило к заметному подавлению этого процесса (рис. 1). Так, в системе метионин—рибофлавин подавление генерации супероксидных радикалов 1 мг стрептокиназы за 8 мин составило 37%. Замена СК сывороточным альбумином человека влияния на кинетику генерации супероксидных радикалов не оказала. В системе НАДН—ФМС 50 мкг СК обусловили снижение генерации супероксидных радикалов на 50% (рис. 1). Степень уменьшения в системе супероксидных радикалов под действием СК зависела от ее концентрации, причем зависимость имела вид кривой с насыщением (рис. 1). Максимальная СОД-активность СК по подавлению генерации супероксидных радикалов составляла 50%. Сывороточный человеческий альбумин на накопление в системе супероксидных радикалов влияния не оказал.

В опытах с использованием системы НАДН—ФМС было установлено, что степень уменьшения стрептокиназой уровня супероксидных радикалов зависела от концентрации компонентов системы. Так, зависимость СОД-активности СК от концентрации НАДН имела вид S-образной кривой (рис. 2), что дает основания полагать, что в данном случае реализуется механизм типа аллостерического.

Приведенные выше материалы показывают, что внесение в системы генерации супероксидных радикалов СК приводит к подавлению на 50% образования радикалов, регистрируемого по образованию формазана. В целях выяснения вопроса о том, не является ли обнаруженное свойст-

во образцов СК результатом примеси другого белка, нами изучены изменения СОД-активности и активаторной функции образцов СК в процессе нагревания при 80 °С. В ходе экспериментов установлено, что изменения СОД-активности и активаторной функции СК были практически идентичны (рис. 2). Расчет коэффициента корреляции изменений дал величину  $r=0,999\pm 0,008$  ( $P<0,01$ ). Это позволяет считать, что наличие в образцах СК СОД-активности не связано с присутствием при-

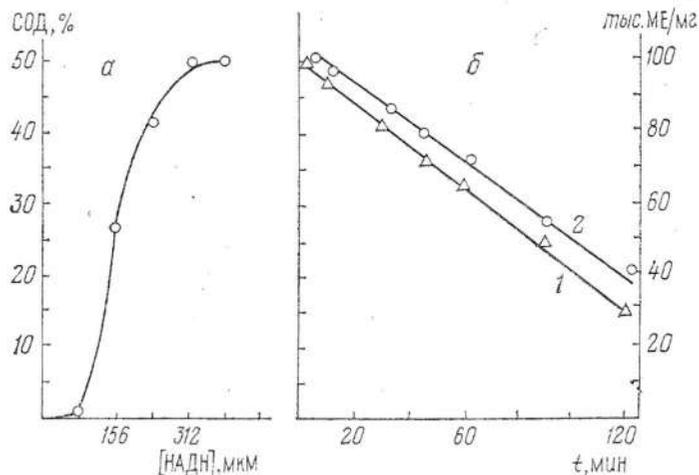


Рис. 2. Влияние концентрации НАДН на СОД-активность стрептокиназы в системе НАДН—ФМС (а) и характер изменений активаторной функции стрептокиназы и ее СОД-активности в процессе нагревания при 80 °С (б) (СОД-активность выражена в % подавления генерации супероксидных радикалов; 1 — активаторная активность стрептокиназы, тыс. МЕ/мг белка, 2 — СОД-активность стрептокиназы)

месей другого белка, а обусловлено свойствами самой молекулы СК.

Полученные данные о наличии у молекулы СК активности, подобной супероксиддисмутазной, дают основания полагать, что в молекуле СК возможно присутствие металлов, с которыми связана реализация подобной функции. Более того, высокая корреляция СОД-активности и активаторной функции СК позволяет также думать, что реализация СОД-активности может быть связана со способностью СК активировать плазминоген человека. Эти факты дополнительно подкрепляют ранее [13] теоретически обоснованное преимущество локального чрезкатетерного введения стрептокиназы в коронарные артерии при остром инфаркте миокарда. Известно, что ишемия миокарда сопровождается накоплением супероксидных радикалов [14], поэтому введение препаратов стрептокиназы непосредственно в зону тромбоза может играть двоякую роль: активируя плазминоген, обеспечивать rekanализацию сосудов и одновременно способствовать снижению уровня супероксидных радикалов, обладающих цитотоксическим эффектом.

### Summary

Addition of streptokinase to the system of superoxide radical generation (methionine—riboflavin or NADH—phenazinemethosulphate) significantly (by 50%) decreases the concentrations of these radicals. In the NADH—phenazinemethosulphate system, the degree of streptokinase inhibition of formazane formation is a nonlinear function of the NADH concentration. Heating of streptokinase solutions results in a loss of both its dismutase-like activity and of its plasminogen-activatory function, the correlation between these parameters being high.

### Литература

1. Никандров В. Н. // Энзимология тромболиза и стрептокиназа. Минск, 1982. С. 23—34.
2. Андреев Г. В. Фибринолиз. Биохимия, физиология и патология. М., 1979. 325 с.
3. Мищенко В. П. // Актуальные проблемы гемостазиологии. М., 1981. С. 153—157.
4. Никандраў В. М. // Весці АН БССР. Сер. біял. навук. 1985. № 3. С. 64—67.
5. Никандров В. Н., Воробьева Г. В., Янковская Г. С. и др. // Молекулярная структура бактериальных токсинов и генетический контроль их биосинтеза: Тезисы докл. I Всесоюз. конф. М., 1985. С. 79—80.
6. Ткач В. М., Каре-

зо Н. В., Постоянова Н. И. и др. // Энзимология тромболитиса и стрептокиназа. Минск, 1982. С. 86—89. 7. Девени Т., Гергей Я. Аминокислоты, пептиды, белки. М., 1976. 364 с. 8. Вотяков В. И., Воробьева Г. В., Никандров В. Н. и др. // Стрептокиназа в регуляции свертывающей и противосвертывающей систем крови. Минск, 1985. С. 74—83. 10. Лапина В. А., Донцов А. Е., Островский М. А. // Биохимия. 1984. Т. 49, вып. 10. С. 1712—1718. 11. Nishikimi M., Rao N. A., Jagi K. // Biochem. biophys. res. commun. 1972. Vol. 46, N 2. P. 849—856. 12. Лакин Г. Ф. Биометрия. М., 1973. 343 с. 13. Вотяков В. И., Никандров В. Н., Савченко А. Н. // Здравоохранение Белоруссии. 1984. № 8. С. 14—19. 14. Афанасьев И. Б. // Кислородные радикалы в химии и биологии. Минск, 1984. С. 13—29.

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

*Поступило 17.12.85*