

УДК 577.15.04:546.215

В. М. НІКАНДРАУ, Н. С. ПЫЖОВА

**АКТЫВАЦЫЯ ПЛАЗМІНАГЕНУ ЧАЛАВЕКА СТРЭПТАКІНАЗАЙ:
УПЛЫЎ H_2O_2 І ЯЕ МАГЧЫМЫ УДЗЕЛ
У ЯКАСЦІ ІНТЭРМЕДЫЯТУ ПРАЦЭСУ**

Шляхі актывацыі плазмінагену (Пг) у актыўную пратэіназу — плазмін (3.4.21.7) застаюцца недастаткова вывучанымі.

Нядаўна намі [1] упершыню выказана меркаванне аб тым, што фібрыноліз, ініцыруемы адным з найбольш эфектыўных актыватараў Пг непратэіназнага дзеяння — стрэптакіназай (СК), з'яўляецца кісла-

розділеним процесам і реалізується при утворенні кислородних радикалів. Гэты працэс замаруджваецца пры выдаленні з раствораў кіслароду або змяшчэнні яго азотам. Адначасова была ўстаноўлена здольнасць Пг чалавека і труса, якія дастаткова лёгка актывіруюцца СК, раскладаць H_2O_2 з утварэннем радыкалаў кіслароду [2], у той час калі Пг быка (ён актывуецца СК з вельмі нізкай скорасцю) раскладаў H_2O_2 са скорасцямі на парадак марудней. Гэта дазволіла нам зрабіць заключэнне аб магчымай наяўнасці сувязі паміж фібрынолізам і працэсамі ўтварэння і ператварэння перакісаў [2], у прыватнасці перакісу вадароду.

Вядома, што H_2O_2 з'яўляецца адным з важных прадуктаў і субстратаў рада акісляльна-аднаўленчых метабалічных рэакцый. Паказана, што H_2O_2 утвараецца пры актывацыі трамбацытаў [3], г. зн. ператварэнні яго звязаны з асобнымі рэакцыямі гемастазу.

Улічваючы ўсе гэтыя абставіны, важнае значэнне набывае неабходнасць высвятлення ўплыву H_2O_2 на рэакцыі фібрынолізу. У гэтай рабоце вывучан уплыў перакісу вадароду на актывацыю Пг чалавека стрэптакіназай.

Матэрыялы і метады. Электрофарэтычна гомогенныя ўзоры СК і ўзоры Пг чалавека атрыманы па метадах, падрабязна апісаных у нашых папярэдніх артыкулах [2, 4]. Актывнасць узораў СК складала 150 000 МАдз/мг бялку, а Пг — 20 казеіналітычных адзінак на 1 мг бялку. Узоры Пг змяшчалі таксама невялікую колькасць актывнага плазміну. Актывнасць СК і Пг вызначалі, як апісана намі раней [2, 4], канцэнтрацыю бялку — па метаду Лоуры [5] або па абсорбцыі пры 280 нм, выкарыстоўваючы значэнні $A_{1\text{см}}^{1\%}$ 9,0 для СК і 17,1 для Пг [6, 7]. Электрофарэз праводзілі ў 12,5%-ным поліакрыламідным гелі з дадэцылсульфатам натрыю пры 4 °С на працягу 16 гадз у рэжыме 40В × 20 мА [8].

Узоры плазміну атрымлівалі аналагічна Пг, аднак для гэтага выкарыстоўвалі сыравіну з зыходна высокай плазмінавай актывнасцю. Атрыманыя ўзоры не змяшчалі плазмінагену і пры электрофарэзе давалі характэрную для ўзораў плазміну карціну: з'яўленне лёгкага і цяжкага ланцугоў бялку.

Актыватарную функцыю СК улічвалі па лізісу фібрынавых пласцін, як падрабязна апісана намі раней [9], з чалавечага фібрынагену, які змяшчаў Пг, і трамбіну. Фібрыналітычную актывнасць плазміну, сумесей плазмінагену (3 мг/мл) са стрэптакіназай або з H_2O_2 вызначалі на пласцінах, папярэдне прагрэтых 30 мін пры 86 °С. Ваганні актывнасці ў паралельных вызначэннях не перавышалі 7%.

Уплыў перакісу вадароду на актывацыю фібрынолізу даследавалі таксама на фібрынавых згустках [1], атрыманых змешваннем 2 мл раствора чалавечага фібрынагену (1 мг/мл), які змяшчае Пг, і 0,2 мл раствора трамбіну (40 адз/мл). Перакіс вадароду ўносілі (0,1 мл) да дабаўкі трамбіну. Згусткі з дабаўкамі H_2O_2 або дыстыляванай вады (кантроль) інкубавалі пры 25 °С на працягу 2 гадз, затым бялкі асаджалі 5 мл 10%-най трыхлорвоцатнай кіслаты, цэнтрыфугавалі. Вызначалі аптычную шчыльнасць празрыстых супернатантаў пры 280 нм, што адлюстроўвае ўзровень кіслотарастваральных прадуктаў пратэолізу (тыразін- і трыптафанзмяшчальныя пептыды). Ва ўсіх доследах СК растваралі ў бідыстыляванай вадзе, астатнія бялкі — у 0,06 М фасфатным буферах рН 7,0.

У рабоце выкарыстоўвалі каталазу з печані быка, азід натрыю («Serva», ФРГ), ВгСN-сефарозу («Pharmacia», Швецыя), ДЭАЭ-цэлюлозу, L-лізіну гідрахларыд, L-трыптафан, нітратэтразоліевы сіні, сываратачны альбумін чалавека («Reanal», ВНР), D-маніт («Chemapol», ЧССР). Чалавечы фібрынаген, які змяшчае Пг, чалавечы трамбін, казеін былі айчынным вытворчасці, як H_2O_2 і іншыя рэактывы маркі х. ч.,

Табліца 2. Уплыў перахватчыкаў кіслародных радыкалаў на актывацыю плазмінагену чалавека H_2O_2 (па лізісу прагрэтых фібрынавых пласцін, $n = 5$)

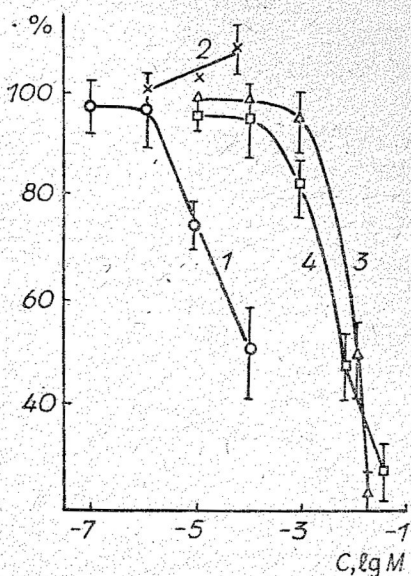
Умова эксперыменту	Плошча зон фібрынолізу, мм^2	Умова эксперыменту	Плошча зон фібрынолізу, мм^2
Плазмінаген (кантроль)	234 ± 14	Плазмінаген + азід натрыю, $10^{-2} \text{ M} + \text{H}_2\text{O}_2$, 5,6 М	$619 \pm 23^*$
Плазмінаген + стрэптакіназа, 750 МАдз.	$702 \pm 29^*$	Плазмінаген + L-трыптафан, $10^{-2} \text{ M} + \text{H}_2\text{O}_2$, 5,6 М	$602 \pm 15^*$
Плазмінаген + H_2O_2 , 5,6 М	$538 \pm 20^*$	Плазмінаген + нітратэтразоліевы сіні, $10^{-2} \text{ M} + \text{H}_2\text{O}_2$, 5,6 М	$70 \pm 2^*$
Плазмінаген + маніт, $10^{-2} \text{ M} + \text{H}_2\text{O}_2$, 5,6 М	$520 \pm 15^*$		

* Адзначаны змяненні, статыстычна верагодныя пры $P \leq 0,05$.

(рыс. 3). Такім дзеяннем не валодаў сываратчны альбумін чалавека, а выкарыстаныя намі ўзоры каталазы не змяшчалі прымесей супераксідысмутазы. У сувязі з гэтым можна думаць, што эфект каталазы ў дадзеным выпадку абумоўлен разбурэннем перакісу вадароду, які ўтвараецца ў сістэме эндагенна. Падобнае з каталазай, але больш слабае дзеянне на ініцыраваны СК фібрыноліз аказалі іоны Cu^{2+} і Fe^{3+} . Гэтыя іоны выкарыстоўваюцца пры мадэліраванні каталазных сістэм [17], таму іх эфект мог быць таксама абумоўлен зніжэннем канцэнтрацыі перакісу вадароду. У той жа час у прысутнасці гэтых іонаў перакіс вадароду раскладаецца па радыкальнаму механізму з утварэннем і такіх радыкалаў, як $\cdot\text{OH}$ і $\cdot\text{OH}_2$. Таму атрыманыя даныя могуць сведчыць таксама аб тым, што радыкалы $\cdot\text{OH}$ і $\cdot\text{OH}_2$ у актывацыі Пг стрэптакіназай удзелу не прымаюць.

Атрыманыя факты дазваляюць дапусціць магчымасць утварэння ў сістэме СК — плазмінаген перакісу вадароду, што, відаць, адыгрывае пэўную ролю ў актывацыі Пг. Аднак пытанне аб шляхах утварэння перакісу вадароду ў адзначанай сістэме патрабуе самастойнага вывучэння.

Такім чынам, выкладзеныя матэрыялы пацвярджаюць магчымасць сувязі фібрынолізу з працэсамі ўтварэння і разбурэння перакісу вадароду. Відаць, перакіс здольны ўдзельнічаць у актывацыі Пг чалавека, аднак, мабыць, ён адыгрывае ролю прамежкавага звяна — крыніцы рада кіслародных радыкалаў. Здольнасць Пг чалавека да актывацыі супераксіднымі радыкаламі можа ляжаць як у аснове яго павольнай аўтаактывацыі, так і хуткай актывацыі ў прысутнасці СК. Аб тым, што ў аснове гэтых двух працэсаў ляжыць адзін і той жа механізм, сведчаць атрыманыя намі даныя аб дзеянні перахватчыкаў супераксідных радыкалаў [18] на актыватарную функцыю СК. Гэта дзеянне аналагічна дзеянню нітратэтразоліевага сіняга на актывацыю Пг пры дабаў-



Рыс. 3. Змяненні ініцыраванага стрэптакіназай фібрынолізу пры дабаўленні каталазы (1), сываратчнага альбуміну (2), CuCl_2 (3) або FeCl_3 (4). Па восі ардынат — актыўнасць, % да зыходнай

ках перакісу вадароду. Пры адсутнасці СК, функцыя якой можа заключацца ў канверсіі суперакідных радыкалаў і папярэджанні дысіпацыі, гэтыя актыўныя формы кіслароду расходуюцца ўпустую. Гэтым, відаць, і можа быць растлумачана нізкая скорасць аўтаакывацыі плазмінагену ў параўнанні з яго актывацыяй стрэптакіназай.

Summary

It is shown that H_2O_2 is capable to enhance directly the streptokinase-dependent fibrinolysis and human plasminogen. Superoxide radicals may probably be important for this process. Streptokinase-dependent fibrinolysis is markedly inhibited by catalase. The slow plasminogen autoactivation and its rapid activation by streptokinase are suggested to be based on the ability of human plasminogen to be activated by oxygen radicals.

Літаратура

1. Никандров В. Н., Пыжова Н. С., Судник Ю. М. // Докл. АН БССР. 1986. Т. 30, № 6. С. 558—560.
2. Никандров В. Н., Судник Ю. М., Вотяков В. И. // Докл. АН СССР. 1986. Т. 287, № 3. С. 751—755.
3. Del Principe D., Menichelly A., De Matteis W. // FEBS Letters. 1985. Vol. 185, N 1. P. 142—146.
4. Нікандраў В. М., Вараб'ёва Г. В., Янкоўская Г. С. і інш. // Весці АН БССР. Сер. біял. навук. 1986. № 6. С. 47—52.
5. Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., Randall R. J. // J. Biol. Chem. 1951. Vol. 193, N 1. P. 265—275.
6. Kirschenbaum D. // Anal. Biochem. 1975. Vol. 68. P. 465—475.
7. Роббинз К. К., Маркус Г. // Фибринолиз. Современные фундаментальные и клинические концепции. М., 1982. С. 69—84.
8. Weber K., Osborn M. // J. Biol. Chem. 1969. Vol. 244, N 16. P. 4406—4411.
9. Никандров В. Н., Пыжова Н. С., Вотяков В. И. // Вопр. мед. химии. 1987. № 1. С. 84—87.
10. Nishikimi M., Rao N. A., Jagi K. // Biochem. biophys. res. commun. 1972. Vol. 46, N 2. P. 849—856.
11. Fliegel S. E. G., Lee E. G., McCoy J. Ph. // Amer. J. Pathol. 1984. Vol. 115, N 3. P. 418—425.
12. Sherry S. // J. Clin. Invest. 1954. Vol. 33. P. 1054—1063.
13. Ablondi F. B., Hagan J. J. // Proc. Soc. Exptl. Biol. Med. 1957. Vol. 95, N 2. P. 195—200.
14. Андреев Г. В. Фибринолиз. Химия и физиология процесса. М., 1967.
15. Разумовский С. Д. Кислород — элементарные формы и свойства. М., 1979.
16. Никандров В. Н., Пыжова Н. С., Вотяков В. И., Клингер Ю. Е. // Докл. АН БССР. 1986. Т. 30, № 11. С. 1033—1036.
17. Метелица Д. И. Моделирование окислительно-восстановительных ферментов. Минск, 1984.
18. Никандров В. Н., Пыжова Н. С., Вотяков В. И., Клингер Ю. Е. // Докл. АН БССР. 1987. Т. 31, № 4. С. 375—378.

Белорусский научно-исследовательский институт
эпидемиологии и микробиологии МЗ БССР

Поступила в редакцию
20.07.87