

ВЕСЦІ АКАДЭМІІ НАВУК БССР

СЕРЫЯ
БІЯЛАГІЧНЫХ НАВУК
№ 3

Асобны адбітак



Мінск 1985

УДК 577.150.3:541.182.644:577.156

В. М. НИКАНДРАУ

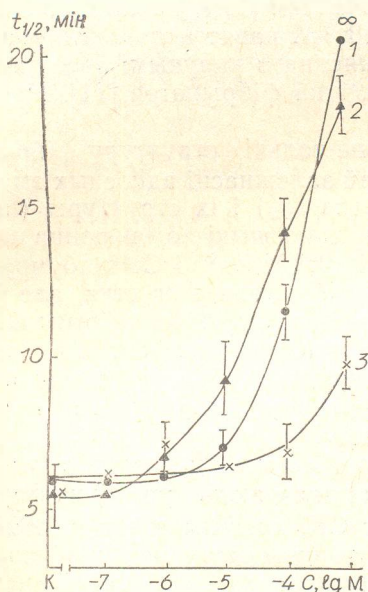
ДЗЕЯННЕ ДВУХВАЛЕНТНЫХ КАТЫЁНАУ НА ІНЦЫПРАВАНЫ СТРЭПТАКІНАЗАЙ ЛІЗІС ФІБРЫНАВЫХ ГЕЛЯУ

Адным з важных фактараў рэгуляцыі звенняў гемастазу з'яўляюцца іоны металаў. Паказана, што парушэнні абмену магнію абумоўліваюць развіццё тромбозу [1]. Змяненне ў арганізме балансу рада металаў назіраецца пры канцэрагенезе [2], які нярэдка суправаджаецца павышэннем згусання крыві і тромбаўтварэннем [3]. Аднак роля іонаў металаў у рэгуляцыі гемастазіялагічных звенняў, асабліва рэакцый фібрынолізу, застаецца вывучанай вельмі недастаткова. У той жа час патрэбнасць карэкцыі фібрынолізу пры паталагічных станах, пошук шляхоў рэгуляцыі тэрапеўтычнага эфекту тромбалітыкаў абумоўліваюць неабходнасць вывучэння дзеяння двухвалентных катыёнаў на рэакцыі фібрынолізу. Сярод механізмаў, якія індуюць фібрыноліз, асаблівую цікавасць уяўляе актывацыя стрэптакіназай, механізм каталітычнага дзеяння якой застаецца недастаткова вывучаным.

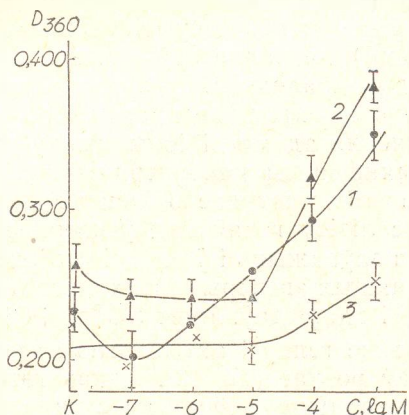
Зыходзячы з вышэйсказанага, а таксама прымаючы пад увагу даныя літаратуры аб уплыве Zn^{2+} , Ca^{2+} , Mg^{2+} на згусанне крыві [4, 5] і зна-

чэнне Co^{2+} , Zn^{2+} для пратэалітычнага каталізу, намі ввывучаны ўплыў двухвалентных катыёнаў Zn , Cu , Co , Mg , Ca на лізіс фібрынавых геляў, які ініцыіруецца стрэптакіназай (СК).

Матэрыялы і метады. Даследаванні праведзены на сістэме фібрынаген — трамбін — плазмінаген — стрэптакіназа. Кінетыку ўтварэння і лізісу фібрынавых геляў улічвалі турбідыметрычна [6, 7] пры $\lambda = 360$ нм і пастаяннай тэмпературы $37 \pm 0,2$ °C. Інкубацыйная сумесь змяшчала 0,8 мл раствору бычынага фібрынагену (2,5 мг/мл), 0,2 мл раствору бычынага трамбіну (20 адз/мл), 0,2 мл раствору СК (160 МАдз), 0,2 мл раствору адпаведнай солі, 1,0 мл раствору плазмінагену чалавека (0,25 мг/мл). Усе бялкі, за выключэннем СК, растваралі ў 0,08 М баратным буферы рН 7,4. Катыёны ўносілі ў канечнай канцэнтрацыі 10^{-7} — 10^{-3} М у выглядзе солей: ZnSO_4 , CuSO_4 , CoSO_4 , MgCl_2 , CaCl_2 . Малярныя суадно-



Рыс. 1. Уплыў іонаў Zn (1), Cu (2) і Co (3) на велічыню часу паўраспаду ($t_{1/2}$) фібрынавых геляў пры лізісе, які ініцыіраваны стрэптакіназай



Рыс. 2. Змяненні максімальнай мутнасці фібрынавых геляў у сістэме фібрынаген — трамбін — плазмінаген — стрэптакіназа ў прысутнасці іонаў Zn (1), Cu (2) і Co (3)

сіны плазмінагену і СК, разлічаныя зыходзячы з малекулярных мас плазмінагену (85 000) і СК (54 000), склалі 50 : 1.

У эксперыментах выкарыстоўвалі бычыны фібрынаген і трамбін Літоўскага НДІЭМГ (серыі, якія не змяшчаюць плазмінаген). Узоры СК атрыманы з дапамогай метаду іонаабменнай храматаграфіі [8]. Удзельная актыўнасць СК ва ўзорах адпавядала 100 000 МАдз/мг бялку. Узоры плазмінагену атрыманы з багатай β -глабулінамі фракцыі крыві метадам кіслотнай экстракцыі [9]. Выкарыстаны хімічна чыстыя солі металаў, дадаткова ачышчаныя перакрышталізацыяй. Актыўнасць СК і колькасць бялку вызначалі па метадах, якія апісаны раней [6].

Па поўных кінетычных крывых мутнасці разлічвалі час паўраспаду фібрынавых геляў ($t_{1/2}$). Усе даследаванні выкананы не менш чым чатырохразова. Вынікі эксперыментаў апрацаваны статыстычна [10].

Вынікі і абмеркаванне. Даследаванні паказалі розную ступень уздзеяння катыёнаў на ініцыіраваны СК лізіс фібрынавых геляў (рыс. 1). Па сіле інгібіруючага ўздзеяння іонаў на фібрыноліз, якое найбольш выразна было выяўлена пры канцэнтрацыі 10^{-5} — 10^{-3} М, яны змяшчаюцца ў наступным парадку: $\text{Zn} > \text{Cu} > \text{Co} > \text{Mg}$, Ca . Іоны магнію і кальцыю аказалі нязначнае дзеянне. Гэта істотна адрозніваецца ад дзеяння катыёнаў на актыўнасць тканкавага актыватару плазмінагену, які актывуецца Cu^{2+} , але поўнасцю падаўляецца Zn^{2+} і Mg^{2+} [4].

Катыёны могуць уздзейнічаць на названы працэс, прынамсі, двума шляхамі: перабудоўваючы структуру фібрыну і змяняючы каталітычныя ўласцівасці плазміну або скорасць яго ўтварэння. Першая магчымасць была прааналізавана на падставе ўліку мутнасці фібрынавых геляў, якія ўтвараюцца ў прысутнасці вывучаемых катыёнаў.

У адпаведнасці з уздзеяннем на мутнасць фібрынавага геля, які ўтвараецца, катыёны можна падзяліць на дзве групы. Zn^{2+} і Cu^{2+} , асабліва пры высокіх канцэнтрацыях, абумоўліваюць грубыя перабудовы структуры геляў (рыс. 2). Змяненні фібрынавых геляў у прысутнасці Co^{2+} , Mg^{2+} , Ca^{2+} менш значныя: ваганні мутнасці геляў у параўнанні з кантролем не перавышаюць 12%, за выключэннем Co^{2+} у канцэнтрацыі 10^{-3} М. Катыён Mg у канцэнтрацыі 10^{-6} — 10^{-5} М нават некалькі паменшыў мутнасць геляў. Гэта поўнасьцю ўзгадняецца з наяўнымі звесткамі аб моцным агрэгуючым дзеянні Zn^{2+} і Cu^{2+} на фібрынаген [11]. Mg^{2+} і Ca^{2+} названых уласцівасцей пазбаўлены.

Аднак уплыў іонаў на працэс закранае не толькі структуру фібрынавага геля. Супастаўленне канцэнтрацыйнай залежнасці адносных змяненняў скорасці лізісу фібрынавых геляў (па $t_{1/2}$) і іх структуры (па мутнасці) дазваляе заўважыць, што гэтыя паказчыкі змяняюцца не заўсёды паралельна. Так, пры канцэнтрацыі 10^{-3} М Zn^{2+} і Cu^{2+} абумоўліваюць аднолькавае павелічэнне мутнасці фібрынавага згустка, але ў адрозненне ад медзі іоны цынку поўнасьцю блакіруюць фібрыноліз. З памяншэннем канцэнтрацыі гэтых іонаў інгібіруючы эффект Cu^{2+} на фібрыноліз выступае больш выразна. Некаторую перавагу ўплыву на працэс лізісу геляў над уздзеяннем на структуру фібрынавага геля можна заўважыць і ў адносінах іонаў кобальту.

У нашых эксперыментах выкарыстаны солі металаў у выглядзе сульфатаў і хларыдаў. Іоны SO_4^{2-} і Cl^- таксама аказваюць уплыў на фарміраванне геляў і актывацыю плазмінагену СК, прычым дзеянне гэтых аніёнаў рознае [12, 13]. Аднак гэтыя эфекты праяўляюцца толькі пры канцэнтрацыях аніёнаў на 2 парадкі больш высокіх, чым максімальная з узятых у нашых доследах. Больш таго, ні ў адным выпадку пры зададзеных умовах па тэсту мутнасці не назіралася падаўленне ўтварэння фібрынавых геляў або запавольванне гэтага працэсу. Гэта дае падставу лічыць, што выяўленыя ў доследах зрухі абумоўлены ўздзеяннем менавіта катыёнаў.

Такім чынам, упершыню вызначана, што іоны Zn , Cu , Co аказваюць рознай ступені інгібіруючы эффект на ініцыраваны СК лізіс фібрынавых геляў. Гэты эффект абумоўлены не толькі ўздзеяннем на структуру фібрынавага геля, а таксама на каталітычныя якасці плазміну і, магчыма, на актывацыю плазмінагену СК. Атрыманыя даныя раскрываюць, прынамсі, два моманты, якія тлумачаць вядомую тромбагеннасць Cu [14]: змяненне структуры фібрынавых згусткаў і падаўленне пратэалітычнай атакі з боку плазміну. Можна меркаваць, што значнай тромбагеннасцю адрозніваецца і Zn . Іоны цынку, медзі, кобальту аказвалі ўплыў на фібрыноліз у канцэнтрацыях, якія, як правіла, перавышаюць фізіялагічны іх узровень у крыватоку. Тым не менш, пры асобных паталагічных станах канцэнтрацыя гэтых металаў у арганізме рэзка ўзрастае [2, 15]. Можна меркаваць, што ў пэўных умовах ваганні ўзроўню двухвалентных катыёнаў у крыватоку здольны змяніць характар тромбалітычнага дзеяння СК.

Summary

Zinc, copper, cobalt ions inhibit streptokinase-induced lysis of fibrinous gels at different rates. This effect is caused by the changes of not only the structure of fibrinous gels but also of the character of proteolytic attack. The changes of the lysis in the presence of copper and zinc can considerably explain the thrombogenic effect of these ions.

Літаратура

1. Duglisch J.—Therapie, 1979, vol. 34, N 1, p. 117—118.
2. Волькенштейн М. В.—Молекулярная биология, 1982, т. 16, № 5, с. 901—929.
3. Nemes St.—Rev. Med. (RSR), 1973, vol. 19, N 3, p. 224—227.
4. Андреевко Г. В., Мигалина Л. А.—Биохимия, 1971, т. 36, № 4, с. 685—689.
5. Кудряшов Б. А. Биологические проблемы регуляции жидкого состояния крови и ее свертывания.—М.: Медицина, 1975.—488 с.
6. Никандров В. Н., Денисевич В. А., Ефимов А. В.—У кн.: Стрептокиназа и другие тромболитические ферменты. Мн., 1979, с. 95—101.
7. Никандров В. Н., Цыманович С. Г.—Тр. III Всесоюз. междуниверситет. конф. по физико-химической биологии. Тбилиси, 1982, т. 2, с. 362—363.
8. Ткач В. М., Пленина Л. В., Карезо Н. В., Пыжова Н. С.—У кн.: Стрептокиназа и другие тромболитические ферменты. Мн., 1979, с. 79—85.
9. Андреевко Г. В. Фибринолиз. Химия и физиология процесса.—М.: Медицина, 1967.—267 с.
10. Ашмарин И. П., Васильев Н. Н., Амбросов В. А.—Быстрые методы статистической обработки и планирование экспериментов.—Л.: Изд-во ЛГУ, 1975.—77 с.
11. Steven F. S., Griffin M. M., Brown V. S., Hulley T. P.—Int. J. Biol. Macromol., 1982, vol. 4, N 6, p. 367—369.
12. Луговской Э. В., Белицер В. А.—Биохимия, 1971, т. 36, № 1, с. 129—136.
13. Radcliffe R., Heinze Th.—in: Regul. Coagulation. N. Y., 1980, p. 551—554.
14. Рентроп К. П., Смит Х., Бланке Х. и др.—Терапевтический архив, 1982, т. 54, № 11, с. 18—21.
15. Хьюз М. Неорганическая химия биологических процессов.—М.: Мир, 1983.—416 с.

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

*Поступила в редакцию
24.09.84*