

ISSN 0365-9615

**БЮЛЛЕТЕНЬ**  
**ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ**  
**БИОЛОГИИ И МЕДИЦИНЫ**

**7**

**1987**

**МОСКВА • МЕДИЦИНА •**

Ключевые слова: стрептокиназа; фибринолиз; адениловые нуклеотиды

В. Н. Никандров, Н. С. Пыжова, В. И. Вотяков

## ВЛИЯНИЕ АДЕНИЛОВЫХ НУКЛЕОТИДОВ НА АКТИВАТОРНУЮ ФУНКЦИЮ СТРЕПТОКИНАЗЫ

Белорусский НИИ эпидемиологии и микробиологии, Минск

Среди факторов регуляции реакций гемостаза заметную роль играют адениловые нуклеотиды. Известно, например, что АДФ является индуктором агрегации тромбоцитов, а АТФ и 3', 5'-АМФ (цАМФ) этот процесс угнетают [1]. Возможность регуляции адениловыми нуклеотидами реакций фибринолиза фактически не изучена, хотя описана [1] активация АТФ некоторых процессов протеолиза.

В этой связи мы предположили, что адениловые нуклеотиды способны оказывать прямое влияние на активаторную функцию стрептокиназы (СК) — синтезируемого  $\beta$ -гемолитическими стрептококками белкового активатора плазминогена человека.

Методика исследования. Исследования проведены на гомогенных гель-хроматографически (на сефадексе G-100) и электрофоретически (в полиакриламидном геле с добавлением додецилсульфата натрия [9]) образцах СК с удельной активностью 100 000—150 000 МЕ на 1 мг белка, выделенных непосредственно из культуральной жидкости  $\beta$ -гемолитического стрептококка штамм Н46А путем сорбции на двуокиси кремния с элюцией 0,1 М раствором карбоната натрия [10], последующей ионообменной хроматографии на ДЭАЭ-целлюлозе в хлоридной форме в 0,05 М трис-НСl-буфере рН 7,4 [3] с элюцией 0,3 М раствором NaCl, осаждением этанолом при рН 5,0 и NaCl в конечной концентрации 10% при рН 2,0. Активность СК определяли по лизису фибриновых пластин [5] или фибриновых сгустков [14], концентрацию белка — по методу Лоури [13] или по величине абсорбции при 280 нм, принимая для СК  $A_{280}^{1\%} = 9$  [12].

Активаторную функцию СК учитывали методом лизиса фибриновых пластин, содержащих человеческий плазминоген [15]. Пластины готовили на строго горизонтальной поверхности, смешивая (на 1 пластину) 9 мл раствора содержащего плазминоген фибриногена человека (3 мг белка в 1 мл), 0,2 мл раствора тромбина (100 ЕД/мл). Белки растворяли в изотоническом растворе NaCl, а СК — в 0,2 М буферном растворе ацетат натрия — HCl рН 3,0 или 0,2 М фосфатном буфере рН 7,0 или 0,1 М буферном растворе глицин-NaOH рН 9,5. На поверхность пластин или в вырезанные в них лунки вносили по 30 мкл раствора СК (1500 МЕ) или смеси ее с изучаемыми веществами. Фибриновые пластины инкубировали на строго горизонтальной поверхности при 37 °С в течение 20 ч и учитывали площадь зон лизиса. Колебания активности в параллельных определениях не превышали 7%. Все исследования выполняли не менее 4 раз, результаты обрабатывали статистически [8].

В работе использовали АДФ-Na<sub>3</sub> («Fluka», Швейцария), пиррофосфат натрия («Merk», ФРГ), D-рибозу («Loba-Chemie», Австрия), ДЭАЭ-целлюлозу, АТФ-Na<sub>2</sub>, АМФ-Na, 2', 3'-АМФ, цАМФ, УТФ-Na, ГТФ-Na, ЦТФ-Na, рибозо-5-фосфат (все — фирмы «Reanal», Венгрия), содержащий плазминоген человеческий фибриноген и человеческий тромбин, урокиназа («Урокинин») были отечественного производства, как и остальные реактивы, которые дополнительно подвергали очистке.

Результаты исследования. Добавление к раствору СК АТФ при рН 7,0 вызывало угнетение инициированного СК фибринолиза при концентрации нуклеотида 10<sup>-1</sup> М (рис. 1). АДФ и АМФ в концентрации 10<sup>-4</sup>—10<sup>-1</sup> М на этот процесс не влияли. Обнаруженное действие АТФ могло обуславливаться наличием дополнительной фосфатной группы и различиями ионизации гидро-

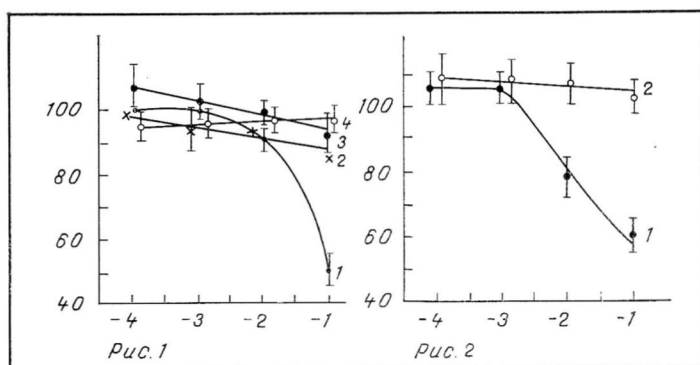


Рис. 1. Влияние добавок АТФ (1), АДФ (2), АМФ (3) или ГТФ (4) на инициируемый стрептокиназой фибринолиз (в % к контролю, принятому за 100 %).

Здесь и на рис. 2: по оси абсцисс — концентрация (lg M).

Рис. 2. Изменения активаторной функции стрептокиназы (по лизису фибриновых гелей, в % к контролю, принятому за 100 %) после добавки к ее раствору 3', 5'-АМФ (1) или 2', 3'-АМФ (2).

Влияние добавок нуклеотидов и их компонентов в конечной концентрации  $10^{-1}$  М к раствору СК на инициируемый ею фибринолиз ( $M \pm m$ ,  $n = 6$ )

Условия опыта	pH	Площадь зон- лизиса, мм <sup>2</sup>	% к контро- лю	Условия опыта	pH	Площадь зон- лизиса, мм <sup>2</sup>	% к контро- лю
СК (контроль)	7,0	411±14	100	СК + ГТФ	7,0	386±25	94
	3,0	390±10	100		3,0	0*	0
	9,5	399±19	100		9,5	455±18	114
СК + АТФ	7,0	206±5*	50	СК + ЦТФ	7,0	362±19	88
	3,0	0*	0		3,0	0*	0
	9,5	263±5*	66		9,5	402±12	101
СК + АДФ	7,0	370±17	90	СК + пирофосфат натрия	7,0	382±19	93
	3,0	0*	0		3,0	362±11	93
СК + АМФ	7,0	432±10	105	СК + рибозо-5-фос- фат	7,0	362±18	88
	3,0	0*	0		3,0	0*	0
	9,5	247±20	60		9,5	200±10*	50
СК + цАМФ	7,0	370±15	90	СК + рибоза	7,0	363±21	88
СК + УТФ	3,0	82±4*	21		3,0	363±18	93
	9,5	387±12	97				

Примечание. Звездочка — изменения статистически достоверны ( $p \leq 0,05$ ).

кислых групп остатков фосфата. Известно также действие нуклеотидфосфатов на реакции перекисного окисления липидов, которое связывают с присутствием примесных ионов железа [2]. Однако ранее мы показали [6], что ионы железа лишь в концентрации  $10^{-1}$  М резко подавляют инициируемый СК фибринолиз. Кроме того, другие нуклеотидтрифосфаты (ГТФ, УТФ, ЦТФ) в конечной концентрации  $10^{-4}$ — $10^{-1}$  М при pH 7,0 не влияли на инициируемый СК фибринолиз (см. рис. 1 и таблицу). Практически никакого эффекта не дали добавки к раствору СК неорганического пирофосфата в концентрации  $10^{-1}$  М (см. таблицу). Это позволяет считать, что угнетение АТФ активаторной функции СК не может быть объяснено ни наличием дополнительной пирофосфатной связи в нуклеотидтрифосфате, ни различиями степени ионизации (вторичные константы ионизации фосфатных групп АТФ, ГТФ, УТФ, ЦТФ очень близки [7]), ни возможными примесями железа.

Более того, если к раствору СК добавить цАМФ, но не 2',3'-АМФ, то наблюдается угнетение активаторной функции СК (рис. 2). Это позволяет предположить, что АТФ и цАМФ в силу конформационных отличий от остальных использованных нами нуклеотидов, возможно, взаимодействуют с компонентами системы СК-плазминоген.

Специфика ингибирующего действия АТФ на инициируемый СК фибринолиз практически сохранялась при pH 9,5, но исчезала при pH 3,0 (см. таблицу). В кислой среде почти все использованные нуклеотиды в конечной концентрации  $10^{-1}$  М полностью подавляли инициируемый СК фибринолиз. Исследования показали, также, что при pH 3,0 активаторная функция СК полностью подавлялась рибозо-5-фосфатом (но не D-рибозой) в конечной концентрации  $10^{-1}$  М (см. таблицу). Можно допустить, что угнетение активаторной функции СК нуклеотидами в кислой среде

обусловлено влиянием остатка рибозо-5-фосфата и, возможно, особым состоянием фосфоэфирной связи.

Изложенные материалы позволяют заключить, что АТФ и цАМФ способны непосредственно воздействовать на активаторную функцию СК в нейтральной среде, вызывая ее угнетение. Описанный эффект существенно отличается от известных примеров влияния нуклеотидов на протеолиз. Так, протеолитическое действие катепсина D заметно усиливается АТФ и другими нуклеотидтрифосфатами, а также пирофосфатом, но не изменяется в присутствии цАМФ [15]. Обнаруженное нами влияние АТФ проявлялось лишь при концентрациях, которые, по крайней мере, на порядок выше известных для животных тканей [4]. Однако после введения препаратов СК в кровоток концентрация ее составляет не более 500 МЕ/мл, что на 2 порядка ниже использованной в наших экспериментах. Это позволяет полагать, что уровень АТФ может влиять на активность СК в кровотоке, а также возможно, и в клетках продуцента. Кроме того, если АТФ и цАМФ способны взаимодействовать с компонентами системы СК — плазминоген, то при активации плазминогена, по-видимому, может иметь место преобразование части молекул АТФ или цАМФ.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Антонов В. К. Химия протеолиза. — М., 1983.
2. Арчаков А. И. Микросомальное окисление. — М., 1975.
3. Девени Т., Гергей Я. Аминокислоты, пептиды, белки: Пер. с англ. — М., 1976.
4. Ленинджер А. Биохимия: Молекулярные основы структуры и функции клетки: Пер. с англ. — М., 1976.
5. Методы исследования фибринолитической системы крови / Г. В. Андреев, М. А. Карабасова, Л. В. Лютова и др. — М., 1981.
6. Никандров В. Н., Воробьева Г. В., Пыжова Н. С. и др. // Всесоюзный биохимический съезд, 5-й: Тезисы стендовых сообщений. — М., 1986. — Т. 2. — С. 14—15.
7. Органическая химия нуклеиновых кислот / Н. К. Ко-

- четков, Э. И. Будовский, Е. Д. Свердлов и др. — М., 1970.
8. Рокицкий П. Ф. Биологическая статистика. — Минск, 1973.
  9. Такач Б. // Методы исследований в иммунологии: Пер. с англ. — М., 1981. — С. 95—119.
  10. Ткач В. М., Карезо Н. В., Постоянова Н. И. и др. // Энзимология тромбозиса и стрептокиназа. — Минск, 1982. — С. 86—89.
  11. Черняк Н. Б. // Проблемы и гипотезы в учении о свертывании крови. — М., 1981. — С. 38—59.
  12. Kirschenbaum D. M. // *Analyt. Biochem.* — 1975. — Vol. 68. — P. 465—484.
  13. Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., Randall R. J. // *J. biol. Chem.* — 1951. — Vol. 193, N 1. — P. 265—275.
  14. Mozen M. M. // *Thrombosis and Bleeding Disorders: Theory and Methods.* — Stuttgart, 1971. — P. 376—379.
  15. Pillai S., Botti R., Zull J. E. // *J. biol. Chem.* — 1983. — Vol. 258, N 16. — P. 9724—9728.

Поступила 23.05.86

## INFLUENCE OF ADENYLIC NUCLEOTIDES ON THE ACTIVATING FUNCTION OF STREPTOKINASE

V. N. Nikandrov, N. S. Pyzhova, V. I. Votyakov

Belorussian Institute of Epidemiology and Microbiology, Minsk

The addition of ATP or 3,5-AMP (but not UTP, GTP, CTP, AMP, 2,3-AMP, ADP, inorganic pyrophosphate) at a final concentration of  $10^{-1}$  M into streptokinase solution, pH 7.0 or 9.5, causes a dramatical inhibition of streptokinase-induced fibrinolysis. The specificity of ATP effect is fully lost at pH 3.0, when all nucleotides completely inhibit the activating function of streptokinase. Ribose-5-phosphate causes a similar effect at pH 3.0. The character of nucleotide action on the activating function of streptokinase considerably differs from their influence on proteolytic reactions.