

ISSN 0002—3558

ВЕСЦІ АКАДЭМІІ НАВУК БССР

СЕРЫЯ
БІЯЛАГІЧНЫХ
НАВУК

1

МІНСК «НАВУКА І ТЭХНІКА»

1990

УДК 576.32/36.08

*В. М. НИКАНДРАУ, Л. С. РУДНИЦКАЯ, М. М. ПАЛЯШЧУК,
Г. С. ДАВЫДАВА*

**СТРЭПТАКІНАЗНАЯ АКТЫЎНАСЦЬ МЕМБРАН КЛЕТАК
β-ГЕМАЛІТЫЧНАГА СТРЭПТАКОКА ГРУПЫ С**

Дэталёвае высвятленне ролі стрэптакока ў паталогіі чалавека, атрыманне са стрэптакокаў розных біяпрепаратаў немагчыма без ведання фізіёлага-біяхімічных асаблівасцей стрэптакокаў, і ў прыватнасці біясінтэзу імі ферментаў і таксінаў. Сярод бялкоў β-гемалітычных стрэптакокаў вялікую цікавасць уяўляе стрэптакіназа. Яна не адносіцца да сапраўдных таксінаў, але валодае выяўленай біялагічнай актыўнасцю,

з'яўляючыся адным з самых моцных актыватараў плазмінагену [1]. Стрэптакіназа мае малекулярную масу ~ 50 кДа, характарызуецца адсутнасцю дысульфідных сувязей і сульфгідрыльных груп [1]. Механізмы рэгуляцыі яе біясінтэзу, метабалічная роля, размеркаванне ў клетцы прадцэнта вывучаны недастаткова. Між тым вырашэнне гэтых праблем важна для пазнання біялогіі мікраарганізма.

Мэта гэтай работы — вывучэнне актыўнасці стрэптакіназы ў мембранах і цытаплазме клетак β -гемалітычнага стрэптакока групы С штама Н46А.

Матэрыялы і метады. β -Гемалітычны стрэптакок штама Н46А вырошчвалі пры 37°C у фермянцёрах ёмістасцю 5 л у рэжыме рН-стата на пажыўным асяроддзі складанага саставу, якое ўключае гідралізат казеіну, глюкозу, вітаміны і мікраэлемэнты [2]. Клеткі ў канцы лагарыфмічнай фазы росту аддзялялі цэнтрыфугаваннем пры 6000 аб/мін, шматразова прамывалі іх 0,06 М фасфатным буферам рН 7,4, які змяшчае 0,85% хларыду натрыю. Адмытыя клеткі суспензавалі ў 0,05 М трыс-НСІ буферы рН 8,0, які змяшчае 25% цукрозы.

Для атрымання фракцыі мембран клеткі апрацоўвалі 0,05%-ным растворам лізацыму, потым пратапласты падвяргалі асматычнаму шоку ў 60-кратным аб'ёме дыстыляванай вады, якая змяшчае ДНКазу (1 мкг/мл) і 0,001 М сульфату магнію [3]. Асколкі мембран аддзялялі на цэнтрыфузе Вексман L-2-65 пры 10 000g на працягу 15 мін. Асадак рэсуспензавалі ў дыстыляванай вадзе і зноў цэнтрыфугавалі. Гэту аперацыю паўтаралі тройчы. Дадатковую ачыстку мембран праводзілі ў градыенце 20—60%-нага раствору цукрозы, цэнтрыфугуючы ўзоры пры 40 000g на працягу 2 гадз пры 4°C .

Для атрымання цытаплазматычнай фракцыі клеткі апрацоўвалі сумессю лізацыму, сульфату магнію і ДНКазы [4]. Асколкі мембран аддзялялі фільтраваннем праз мембрану «Сынпор» з дыяметрам пор 0,45 мк.

У культуральнай вадкасці, цэльных клетках, фракцыі мембран і цытаплазме вызначалі плазмінаген-актыватарную і прамую фібрыналітычную актыўнасць па метаду лізісу фібрынавых пласцін бычынага і чалавечага фібрыну, як падрабязна апісана намі раней [5]. Для вызначэння прамой фібрыналітычнай актыўнасці выкарыстоўвалі пласціны пасля папярэдняй інактывацыі плазмінагену ультрафіялетавым апрамяненнем [6]. Колькасць бялку вызначалі мадыфікаваным метадам Лоўры [7].

Антысываратку да стрэптакіназы атрымлівалі імунізацыяй трусаў ачышчанай стрэптакіназай са стымулятарам Фрэйнда [8]. Для гэтых мэт стрэптакіназу вылучалі з камерцыйнага прэпарата стрэптакіназы «цэліазы» метадам іонаабменнай храматаграфіі на ДЭАЭ-сефадэксе [9].

Электронна-мікраскапічныя даследаванні выкананы на прыборы СХ-100-11 («Joel», Японія), негатыўнае кантраставанне праводзілі 2%-ным растворам фосфарна-вальфрамавай кіслаты.

Усе даследаванні праведзены не менш, чым трохразова, вынікі апрацаваны статыстычна з разлікам t -крытэрыю Ст'юдэнта. У рабоце выкарыстаны прэпараты стрэптакіназы авелізін (ГДР) і цэліаза (айчынай вытворчасці), ДЭАЭ-сефадэкс А-50 («Pharmacia», Швецыя), лізацым («Reanal», ВНР), ДНКаза, а таксама чалавечы і бычыны фібрынагену і трамбін, якія змяшчалі плазмінаген, былі айчынай вытворчасці, як і астатнія рэактывы (маркі х. ч.), якія падвяргалі дадатковай ачыстцы.

Вынікі і іх абмеркаванне. Актыўнасць стрэптакіназы выяўляецца як у клетках гемалітычнага стрэптакока, так і ў бясклетачнай культуральнай вадкасці (табліца). Пры гэтым выдаленне клетак з культуральнай вадкасці прыводзіць да змяншэння стрэптакіназнай актыўнасці апошняй на 14—39%.

Электронна-мікраскапічнае даследаванне паказала, што клеткі

стрэптакока маюць правільную круглявую форму, даюць адчуванне ўнутранага тургору, не маюць пашкодванняў (рысунак, а). Шматразовыя адмыванні клетак мікраарганізма забуфераным растворам цукрозы не прывялі да знікнення ў іх стрэптакіназнай актыўнасці. Гэта сведчыць аб тым, што актыўнасцю валодаюць паверхневыя структуры неразбураных клетак стрэптакока.

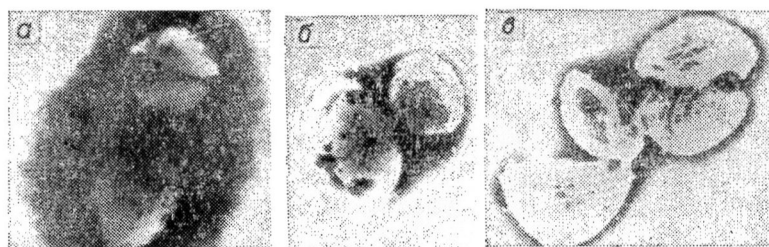
З дапамогай апрацоўкі клетак стрэптакока лізацымам і ДНКазай з наступным асматычным шокам нам удалося атрымаць мембранную

Актыўнасць стрэптакіназы ў культуральнай вадкасці, цэльных клетках β-гемалітычнага стрэптакока і яе фракцыях (n=4)

Даследуемы аб'ект	Актыўнасць стрэптакіназы, МАдз.	
	у 1 мл	на 1 мг бялку
Культуральная вадкасць з клеткамі мікраарганізма пры тэрміне культывавання, гадз:		не даслед.
4	1761±76	»
5	2424±31	»
6	2447±57	»
Культуральная вадкасць пасля выдалення мікробных клетак пры тэрміне культывавання, гадз:		
4	1079±77	9382±350
5	2081±118	7707±233
6	1838±64	8168±157
Цэльныя клеткі стрэптакока	73±9	4±0,3
Мембраны клетак	65±3	38±3
Цытаплазма	0	0

фракцыю стрэптакока і цытаплазму. Як паказана пры электронна-мікраскапічным вывучэнні, апрацоўка лізацымам выклікае разбурэнне паверхневага слоя, яго разрыхленне (рысунак, б). У асколкаў мембран знікае круглявасць формы цэльнай клеткі. Унутрыклетачны тургор не адчуваецца з-за страты ўнутранага змесціва (рысунак, в).

Даследаванні паказалі, што стрэптакіназнай актыўнасцю валодае толькі мембранная фракцыя стрэптакокавай клеткі, але не цытаплазма (табліца). Пры гэтым удзельная актыўнасць мембраннай фракцыі на парадак вышэй, чым у цэльных клетках. Актыўнасць стрэптакіназы ў мембраннай фракцыі практычна не змяняецца пры шматразовых паслядоўных прамываннях дыстыляванай вадой або буферным растворам. Гэта, на нашу думку, з'яўляецца сведчаннем дастаткова трывалай сувязі малекул стрэптакіназы з мембранамі стрэптакока. У той жа час удзельная актыўнасць стрэптакіназы ў мембраннай фракцыі стрэптакокаў на



Інтактныя клеткі β-гемалітычнага стрэптакока (а), пратапласты пасля апрацоўкі клетак лізацымам (б) і ачышчаная фракцыя мембран стрэптакокавых клетак (в). ×27 000, негатыўнае кантраставанне фосфарна-вальфрамавай кіслотой

два парадкі саступае такой у культуральнай вадкасці. Гэтыя абставіны можна растлумачыць наступнымі прычынамі. Вядома, што пры культуры-ваванні стрэптакокаў нават на багатых тканкавымі экстрактамі пажыўных асяроддзях узровень агульнага бялку ў фільтраце культуральнай вадкасці не перавышае 1 мг/мл [10]. У разліку на сухі астатак гэта велічыня звычайна не перавышае 10%. У той жа час у мембранах клетак колькасць бялкоў можа дасягнуць 75% сухога астатку [11].

Другой прычынай можа з'яўляцца высокая канцэнтрацыя ў клетках злучэнняў, якія эфектыўна прыгнечваюць актыўнасць стрэптакіназы. Аб магчымасці сінтэзу стрэптакокавай клеткай метабалітаў, што інгібіруюць актыўнасць стрэптакіназы, паведамлялася яшчэ ў 1952 г. [12]. Аднак да гэтага часу канкрэтных даных па гэтаму пытанню ў літаратуры няма. Улічваючы нядаўна выяўлены ўдзел супераксіднага радыкала ў рэалізацыі актыватарнай функцыі стрэптакіназы [13], можна меркаваць, што падобнымі ўласцівасцямі валодаюць кампаненты мембраны, здольныя перахопліваць гэтыя радыкалы.

Як паказана ў нашых даследаваннях, актыўнай стрэптакіназы ў цытаплазме стрэптакокавай клеткі няма. Праўда, нельга выключыць магчымасць наяўнасці стрэптакіназы ў цытазоле ў латэнтным і неактыўным станах. Гэта пытанне патрабуе асобнага вывучэння.

Трэба адзначыць, што ў спецыяльных доследах намі паказана адсутнасць уплыву лізацыму, ДНКазы і сульфату магнію ў выкарыстаных канцэнтрацыях на актыватарную функцыю ачышчанай стрэптакіназы.

Даследаванне здольнасці мембраннай фракцыі актываваць плазмінаген чалавека або быка і лізіраваць фібрын паказала, што ачышчанае стрэптакіназа і мембранная фракцыя клетак гемалітычнага стрэптакоку выклікаюць з'яўленне зон фібрынолізу. На пласцінах жа чалавекага фібрыну, дзе плазмінаген інактываваны ультрафіялетавым апрамяненнем, а таксама на апрамененых і неапрамененых пласцінах бычынага фібрыну зоны фібрынолізу не з'яўляліся. Таму можна лічыць, што ў мембранах стрэптакока прысутнічае іменна стрэптакіназа. Дадатковае пацвярджэнне гэтага пункту погляду дасягнута з дапамогай спецыфічнай антысывараткі да стрэптакіназы. Гэта антысываратка цалкам прыгнечвала плазмінагенактыватарную здольнасць як ачышчанай стрэптакіназы (548 ± 27 МАдз/мл без антысывараткі і 0 МАдз/мл з антысывараткай), так і плазмінагенактыватарную здольнасць мембран стрэптакока (333 ± 0 і 0 МАдз/мл адпаведна).

Значыць, намі ўпершыню ўстаноўлена, што ў мембраннай фракцыі клетак гемалітычнага стрэптакока прысутнічае функцыянальна актыўная стрэптакіназа. Пытанне аб ролі яе ў мембранах клеткі пакуль застаецца адкрытым. Яго вырашэнне патрабуе паглыбленага вывучэння і выдзялення функцыянальных ансамбляў мембраны. Аднак адсутнасць актыўнай стрэптакіназы ў цытаплазме, здольнасць гэтага бялку ажыццяўляць каінверсію супераксідных радыкалаў [14], падаўленне яго актыўнасці АТФ і цАМФ [15] даюць падставу меркаваць, што стрэптакіназа можа быць кампанентам, неабходным для функцыянавання мембран стрэптакока. Выяўленыя факты ствараюць прадпасылкі для новых падходаў да атрымання культуральнай вадкасці з высокай актыўнасцю стрэптакіназы.

Аўтары выказваюць падзяку Н. Л. Шаціла, Т. М. Лапушкінай і Е. У. Серабраковай за дапамогу пры правядзенні даследаванняў.

Summary

The integrated undamaged cells of β -hemolytic streptococcus (strain H46A) are shown to possess streptokinase activity. The membrane fraction and cytosol were isolated from microbial cells, but the membrane fraction only possesses streptokinase activity. This activity does not decrease during successive repeated washings by distilled water or diluted solutions of salts. The ability of hemolytic streptococcus membranes to activate only a human plasminogen was demonstrated. This ability is suppressed by anti-streptokinase serum.

Літаратура

1. Landmann H. // Folia Haematol. 1976. Bd 103. S. 437—444.
2. Давыдова Г. С., Рытик П. Г., Шатило Н. Л. // Стрептокиназа в регуляции свертывающей и противосвертывающей системы крови. Минск, 1985. С. 58—64.
3. Разин Ш., Роттем Ш. // Биохимическое исследование мембран. М., 1979. С. 9—29.
4. Криг Н. // Методы общей бактериологии. М., 1983. Т. 1. С. 277—355.
5. Никандров В. Н., Пыжова Н. С., Вотяков В. И. // Вопросы мед. химии. 1987. Т. 33, № 1. С. 84—87.
6. А. с. 1472508 (СССР). // Бюл. изобрет. 1989. № 14.
7. Spooner R. L. // Vox Sang. 1970. Vol. 18. P. 34.
8. Давыдова Г. С., Ведерникова Л. В. // Здравоохран. Белоруссии. 1981. № 7. С. 13—14.
9. Никандров В. Н., Казючиц О. А. // Биохимия. 1988. Т. 53, № 3. С. 508—515.
10. Шатило Н. Л., Никандров В. Н., Кузина А. И. и др. // Стрептокиназа и другие тромболитические ферменты. Минск, 1979. С. 58—63.
11. Мецлер Д. Биохимия. М., 1980. Т. 1.
12. Wasserman A. E. // Arch. biochem. biophys. 1952. Vol. 41. P. 158—165.
13. Никандров В. Н., Пыжова Н. С., Вотяков В. И., Клиггер Ю. Е. // Докл. АН БССР. 1987. Т. 31, № 4. С. 375—378.
14. Никандров В. Н., Пыжова Н. С., Вотяков В. И., Клиггер Ю. Е. // Докл. АН БССР. 1986. Т. 30, № 11. С. 1033—1036.
15. Никандров В. Н., Пыжова Н. С., Вотяков В. И. // Бюл. эксперим. биол. мед. 1987. Т. 103, № 7. С. 49—51.

*Беларускі навукова-даследчы інстытут
эпідэміялогіі і мікрабіялогіі
Міністэрства аховы здароўя БССР*

*Паступіў у рэдакцыю
26.12.88*