

УДК 612.115:616.151.5

І.П.Кайдашев

Можливість неферментативної активації протромбіну за умов вільно-радикального окислення

В данном исследовании представлены экспериментальные обоснования возможности неферментативной активации протромбина свободными радикалами кислорода. После 30 мин воздействия кислородными радикалами, генерируемыми железо-аскорбатной системой, на молекулу протромбина мы обнаружили появление тромбиновой активности. Обработанный таким образом протромбин становился способным коагулировать фибриноген с образованием фибринового сгустка. Высокоэффективный жидкостно-хроматографический спектр такой субстанции демонстрировал наличие четырех новых фракций по сравнению с исходным препаратом тромбина. Предположительно активация протромбина происходит вследствие расщепления связей аргинина. Неферментативные превращения биологически активных веществ в организме с участием активных форм кислорода могут являться аварийной системой в экстремальных условиях жизнедеятельности организма.

Вступ

Взаємозв'язок процесів вільно-радикального окислення (ВРО) і зсідання крові багато років залишається в центрі уваги вчених. Як сполучна ланка між цими процесами вивчалися перекиси ліпідів, дестабілізація мембран тромбоцитів, окисдаивне ураження ендотелію та інших клітин організму [1, 4—6]. За фізіологічних умов при розвитку патологічних станів існує тісна кореляція коагуляційного потенціалу організму, активності антиоксидантних ферментів і перекисного окислення ліпідів (ПОЛ) [5]. Не дивлячись на доказанність існування такого зв'язку, не зрозумілі механізми його реалізації.

Існує точка зору, що одним із факторів прокоагуляції є пряма дія вільних радикалів (ВР) на білки — фактори зсідання крові. Останні за своєю біохімічною сутністю є гідролазами і підпорядковані тим же закономірностям взаємодії з ВР, що й інші ферменти цієї групи. Спостерігається проста експоненціальна залежність відносної збереженої активності від дози пошкоджуючого впливу [7, 9].

Таким чином, посилення інтенсивності ВРО повинно призводити до зменшення активності факторів зсідання. Проте, на практиці зустрічаються зворотні явища. Це дало нам підстави припустити, що ВР кисню спроможні активувати перетворення проферментів. З метою перевірки цього припущення ми вивчили зміни активності препарату протромбіну під впливом ВР, які генерує залізо-аскорбатна система.

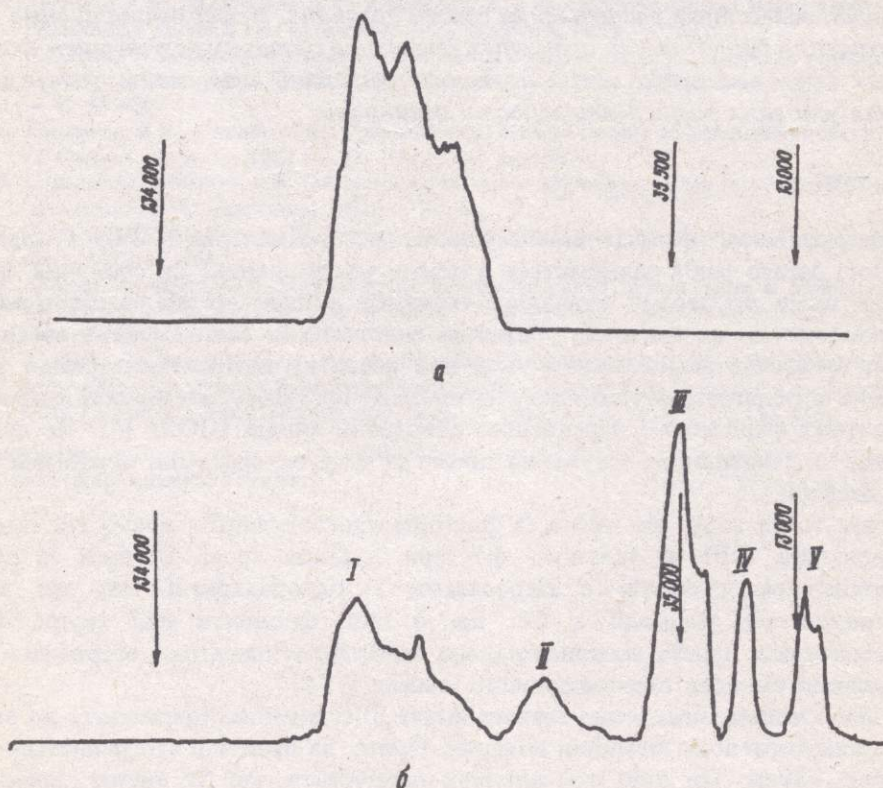
Методика

Використовували комерційний препарат протромбіну людини фірми «Діагностикум» (Львів), який застосовували в концентрації 0,5 мг/мл. Як прооксидантну систему використовували: 0,5 ммоль/л аскорбату, 12

ммоль/л $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 100 ммоль/л *трис*-HCl-буфер (pH 7,4). Контролем був *трис*-HCl-буфер 100 ммоль/л (pH 7,4). Після внесення протромбіну в реакційну суміш крізь неї продували повітря і інкубували 30 хв при 37 °C. Перетворення протромбіну вивчали за методом вискоєфективної рідинної хроматографії (ВЕРХ) на приладі Міліхром-4-ВУФ, колонка 2 · 80 мм, сорбент «Тоуоpearl-HW-55» фірми «Тоуо Soda» (Японія), елюєнт — 100 ммоль/л *трис*-HCl-буфер (pH 7,4), детекція 210 нм. Маркери молекулярної маси — альбумін сироватки бика (134 000), пепсин (35 000), цитохром с (13 000) фірми «Reanal» (Угорщина). Ферментативну активність оцінювали за здатністю 0,1 мл реакційної суміші коагулювати 0,5 мл розчину фібриногену (Литва; 300 мг/100 мл). Всього було вивчено 15 препаратів протромбіну.

Результати та їх обговорення

Як показали дослідження, інкубація протромбіну в прооксидантній системі викликала істотну зміну хроматографічного спектру (малюнок). Про-



Стан нативного (а) протромбіну і протромбіну після дії вільних радикалів (б) за результатами хроматографії: I, II, III, IV, V — відповідні фракції протромбіну (пояснення див. у тексті).

тромбін, який інкубували в *трис*-HCl-буфері був представлений однією основною фракцією з молекулярною масою 70 000—100 000 кг/моль і не характеризувався тромбіновою активністю. Після 30 хв впливу ВР фракція протромбіну зменшилась і виникали нові (таблиця). Одночасно з'явилася виражена ферментативна активність, що виявлялася в утворенні згустку фібрину.

Вплив активних форм кисню на активацію протромбіну

Показник	До дії прооксидантної системи	Після дії прооксидантної системи				
		1-а фракція	2-а фракція	3-а фракція	4-а фракція	5-а фракція
Питома вага, %	100	37,4	7,6	38,7	8,3	11,0
Молекулярна маса, кг/моль	70 000-100 000	70-100	55-65	30-40	20-30	10-20

Відповідно даним [2] під час активації протромбіну фактором Ха в першу чергу підлягають гідролізу два поверхнево розташовані зв'язки Арг-Тре і Арг-Лей з вивільненням протромбіну 2 (37—40 кг/моль) і профрагменту (31—37 кг/моль). Потім гідролізується зв'язок Арг-Сер і вивільняється фрагмент 1 (18—29 кг/моль) і протромбін 1 (57—65 кг/моль), фрагмент 2 (11—19 кг/моль). Фракція I відповідає негідролізованому протромбіну, фракція II — протромбіну II; фракція III — протромбіну II, тромбіну і профрагменту; фракція IV — фрагмент I; фракція V — фрагмент II (див. таблицю).

Таким чином, вплив ВР кисню викликає розрив молекули протромбіну з вивільненням субстанцій з тромбіновою активністю. Оскільки утворення тромбіну зв'язано з розривом зв'язків аргініну, можна припустити, що атака ВР відбувається саме в цих ділянках (це узгоджується з унікальними стереохімічними і електронними властивостями радикалу аргініну). Слід зазначити, що багато факторів зсідання крові активуються гідролізом зв'язків аргініну: фібриноген — Арг-Глі; фактор XIII — Арг-Глі; фактор X — Арг-Глі, Арг-Лей; фактор XII — Арг-Вал.

Останнім часом з'явилися праці в яких показано, що ВР кисню можуть брати участь в активації комплементу, що може призвести до конформаційних змін у C5, перетворюючи його в функціонально активну молекулу системи комплементу. Причому ця молекула — краший субстрат плазменого калікреїну ніж нативний C5 і набагато більш стабільний ніж C5b, одержаний конвертазами комплементу [11]. Імуноглобуліни, зокрема класу G, також можуть підлягати неферментативному відриву галактози під впливом ВР, які генеруються активними фагоцитами [10]. Раніше нами була показана можливість активації рецепторних молекул шляхом десіалізації під дією ВР [6]. Найважливіше місце серед активних форм кисню належить радикалу ОН [12].

За нашим міркуванням, існування неферментативної активації та деградації біологічно активних речовин у живих організмах має біологічну доцільність. При порушенні метаболічних процесів у клітині, викликаних тим чи іншим агентом, у випадку неадекватності та розділенні ферментативних систем, антиоксидантної також, спостерігається спалах ВРО [8]. Одночасно збільшується локальний прооксидантний потенціал у тканинах, внаслідок чого виникає неферментативна активація ферментів, хемоатрактантів тощо. Посилення ефектів хемотактичних агентів викликає міграцію фагоцитів із значним збільшенням локального протиолітичного потенціалу і ще більшим — прооксидантного. За цих умов активуються фактори зсідання та відокремлюється ділянка зміненої тканини. У більш пізні терміни можлива і неферментативна деградація ферментів й інших речовин. Ми припускаємо, що неферментативні перетворення з участю ВР є аварійною системою за умов значних метаболічних змін у клітинах.

I.P.Kaidashev

POSSIBILITY OF UNENZYMIC ACTIVATION OF PROTHROMBIN
UNDER CONDITIONS OF FREE-RADICAL OXIDATION

The existence of the prothrombin unenzymic activation by free oxygen radicals is experimentally proved. It has been found out that the 30-min-long action of free radicals generated by the ferum-ascorbic system induced the thrombin activity. The HPLC-spectrum of this reaction mixture demonstrated four new fractions. A conclusion is made that there is an accidental system in the body responsible for the activation and degradation of bioactive substances.

The Poltava Medical Stomatological Institute,
Ministry of Public Health of Ukraine

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Ажгихин И.С. Простагландины. — М.: Медицина, 1978. — 416 с.
2. Бышевский А.Ш., Терсенов О.А., Галян С.Л. и др. Биохимические компоненты свертывания крови. — Свердловск: Изд-во Урал. ун-та, 1990. — 212 с.
3. Кайдашев И.П., Катрушов А.В., Мищенко В.П. Влияние ферментативной обработки мембран эритроцитов на их взаимодействие с нейтрофильными лейкоцитами // Физиол. журн. — 1993. — 39, № 1. — С. 19—24.
4. Кузник Б.И., Васильев Н.В., Цыбиков Н.Н. Иммуногенез, гемостаз и неспецифическая резистентность организма. — М.: Медицина, 1989. — 320 с.
5. Мищенко В.П., Лобань-Черета Г.А. Корреляция антиоксидантной и свертывающей системы крови в физиологических условиях // Физиол. журн. — 1989. — 35, № 1. — С. 9—13.
6. Мищенко В.П., Кайдашев И.П., Катрушов А.В., Силенко Ю.И., Цебржинский О.И. Влияние нейтрофильных лейкоцитов на состояние липидной пероксидации в эритроцитах и его физиологическое значение // Там же. — 1990. — 36, № 6. — С. 55—59.
7. Тимофеев-Ресовский Н.В., Савич А.В., Шальнов М.И. Введение в молекулярную радиобиологию (физико-химические основы). — М.: Медицина, 1981. — 320 с.
8. Цебржинский О.И. Некоторые аспекты антиоксидантного статуса // Физиология и патология перекисного окисления липидов, гемостаза и иммуногенеза. — Полтава, 1993. — С. 120—155.
9. Adams G.E., Redpath J.L., Biby R.H., Cundall R.B. Free radical action // J.Chem. Soc. Faraday Trans. — 1973. — 1, № 69. — P. 1608.
10. Griffiths H.R., Lunec J. The effects of oxygen free radicals on the carbohydrate moiety of Ig G // FEBS Lett. — 1989. — 245, № 1—2. — P. 95—99.
11. Vogt W., Damerau B., Zabern I. von. Nonenzymic activation of the fifth component, by oxygen radicals. Some properties of the activation products, C5b-like C5 // Mol. Immunol. — 1989. — 26, № 12. — P. 1133—1142.
12. Ward P.A., Warren J.S., Johnson K.J. Oxygen radicals, inflammation, and tissues injury // Free Radic. Biol. and Med. — 1988. — 5, № 5—6. — P. 403—408.

Укр. мед. стомат. академія
М-ва охорони здоров'я України

Матеріал надійшов
до редакції 24.06.93