

Zakład Fizjologii Człowieka AM oraz  
Katedra Patofizjologii AR w Lublinie

BARBARA BOROWICZ, ANDRZEJ LEDWOŻYW

*Oznaczanie aktywności antyplazminy w osoczu krwi koni,  
bydła, owiec i świń*

Antiplasmin estimation in livestock blood plasma

Szereg białkowych inhibitorów krzepnięcia i fibrynolizy posiada aktywność antyplazminową (8, 13, 15, 30). Szczegółowo pod tym względem badano  $\alpha_2$ -makroglobulinę (10, 12), kofaktor antytrombina III – heparyna (15), inhibitor  $\alpha_1$ -antytrypsyny (27), inhibitor esterazy C1 (26). Do połowy lat siedemdziesiątych uważano  $\alpha_2$ -makroglobulinę za główny czynnik antyplazminowy osocza, dopóki Collen (7) oraz Mullertz i Clemmensen (23) nie donieśli o odkryciu szybko działającego inhibitora plazminy w osoczu, o zupełnie różnych właściwościach fizykochemicznych. Odkrycie to zostało następnie potwierdzone przez innych autorów (9, 21, 31). Czynniki te nazwany zostały szybko działającą antyplazminą lub inhibitorem  $\alpha_2$ -plazminy. Doniesiono o zmianach jego poziomu w różnych stanach chorobowych (3, 22), trudno jednak przeceniać znaczenie tych obserwacji, gdyż stosowane do oznaczania poziomu antyplazminy metody kazeinolityczne (25) czy metody oparte na lizie skrzepu włóknikowego (4) nie mają dostatecznej czułości lub wymagają dużej objętości próbki osocza. Może to wpłynąć ujemnie na specyficzność oznaczenia z powodu możliwej interferencji innych, niespecyficznych inhibitorów plazminy obecnych w osoczu. Wprowadzenie syntetycznych substratów chromogennych (11, 24, 29) do badań nad składnikami układu krzepnięcia i fibrynolizy pozwoliło na opracowanie bardziej czułych i specyficznych metod.

W innych publikacjach (16, 17, 18) wykazaliśmy przydatność substratów chromogennych do oznaczania czynnika VII, czynnika VIII i endogennej heparyny w osoczu krwi dużych zwierząt gospodarskich.

Celem niniejszej pracy było określenie przydatności substratu S-2251 (p-nitroanilidu H-D-valilo-leucylo-lizyny) do oznaczania aktywności antyplazminy w osoczu krwi koni, bydła, owiec i świń.

MATERIAŁ I METODY

Do badań użyto osocza 18 koni (wielkopolska, wiek 4-8 lat, ogiery, stadnina Posadowo), 21 owiec (merynos, wiek 2-3 lata, samice, owczarnia Uhrusk), 24 krów (nbc, samice, wiek 3-4 lata, z gospodarstw prywatnych) i 20 świń (rasy wbp, samice, z tuczarni prywatnych). Osocze otrzymywano



z cytrynizowanej krwi (1 obj. 0,1 M cytrynianu sodu + 9 obj. krwi) przez wirowanie 20 min. przy 2000 g. Przed oznaczeniem osocze (100  $\mu$ l) mieszano z 3 ml 0,05 M buforu Tris-HCl o pH 7,3. Krew pobierano przez nakłucie żyły jarzmowej w przypadku koni, bydła i owiec oraz żyły brzeżnej ucha w przypadku świń.

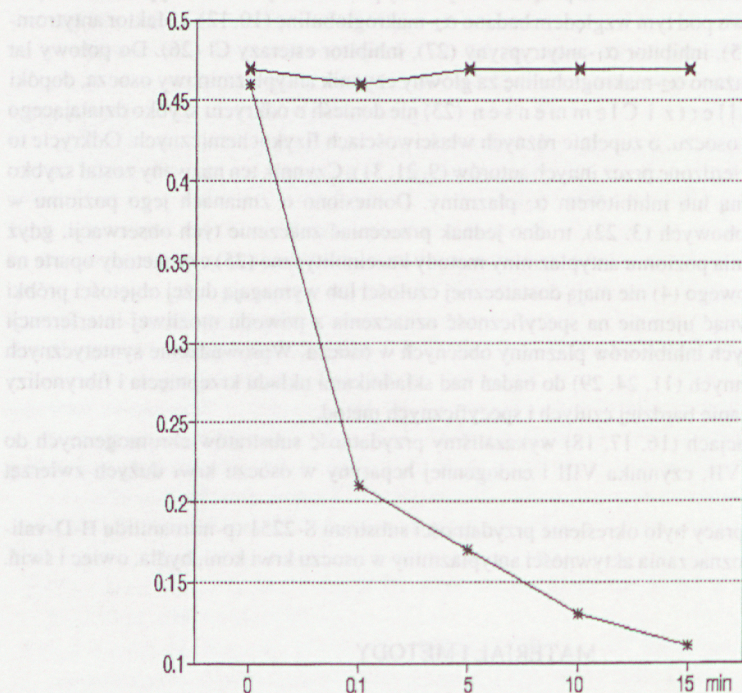
Antyplazmina osocza reaguje z nadmiarem dodanego roztworu plazminy dając kompleks plazmina-antyplazmina. Pozostała część plazminy odszczepia p-nitroanilinę od syntetycznego substratu chromogenego S-2251 oznaczaną metodą kolorymetryczną przy długości fali 405 nm. Plazminę (2,2  $\mu$ kat/ml) rozpuszczoną w glicerolu zawierającym 2 mM HCl oraz 3,5 mM roztwór substratu S-2251 otrzymano z firmy Kabi Vitrum (Molndal, Szwecja).

Do termostатовanej (37°C) kuwety spektrofotometru wlewano 600  $\mu$ l rozcieńczonego osocza i 200  $\mu$ l roztworu substratu S-2251 i mierzono  $\Delta E_{405}/\text{min}$ . Do każdej serii oznaczeń wykonywano oznaczenie "całkowitej aktywności plazminy" biorąc zamiast próbki osocza 600  $\mu$ l buforu.

Jedna jednostka inhibitora (U) definiowana jest jako ilość inhibitora hamująca aktywność  $\mu$ kat (tj. 60 jednostek międzynarodowych).

### WYNIKI

Na ryc. 1 przedstawiono krzywą hamowania aktywności plazminy przez osocze bydła w zależności od czasu inkubacji. Występuje nagły spadek aktywności plazminy w czasie reakcji 0 (600  $\mu$ l rozcieńczonej próbki mieszano najpierw z 200  $\mu$ l

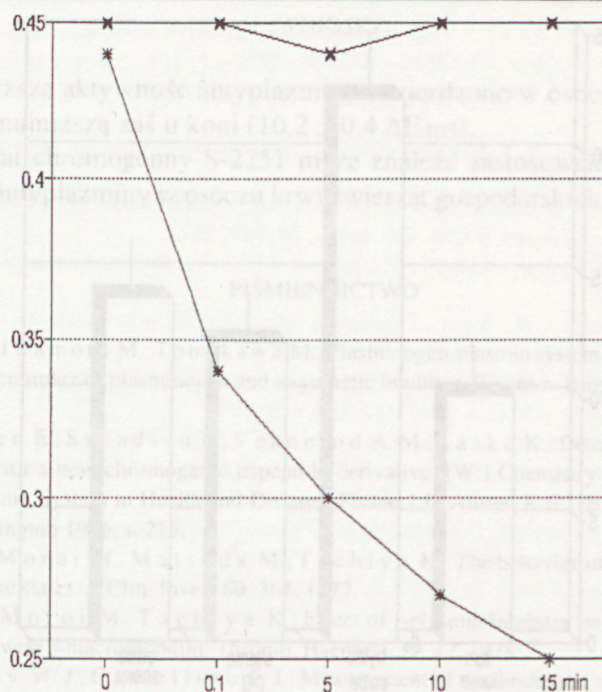


Ryc. 1. Hamowanie aktywności plazminy przez osocze bydła w zależności od czasu inkubacji ( $\Delta E_{405}$ ).

\* - osocze, x - bufor

Inhibition of plasmin activity by cattle plasma as dependent from incubation time ( $\Delta E_{405}$ ) \* - plasma, x - buffer





Ryc. 2. Wpływ kwasu  $\epsilon$ -aminokapronowego na hamowanie aktywności plazminy przez antyplazminę ( $\Delta E_{405}$ )\* – bufor, x – osocze

Effect of  $\epsilon$ -aminocaproic acid on inhibition of plasmin activity by antiplasmin ( $\Delta E_{405}$ )\* – buffer, x – plasma

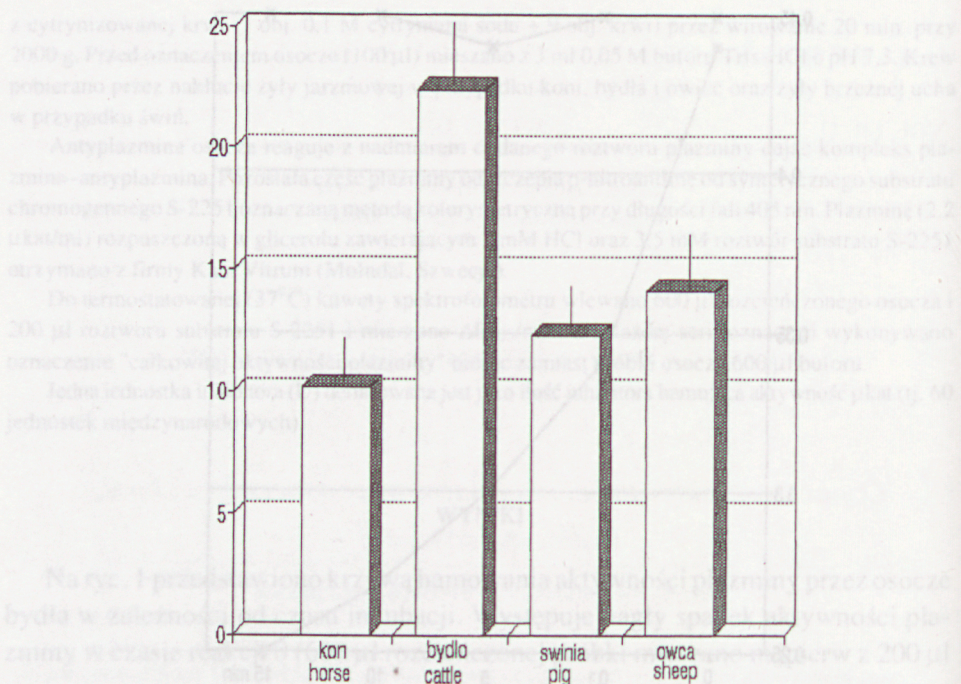
roztworu substratu, a później z 200  $\mu$ l roztworu plazminy), z późniejszym dalszym obniżaniem się jej aktywności. Ryc. 2 ilustruje wpływ kwasu  $\epsilon$ -aminokapronowego (EACA) na hamowanie plazminy przez antyplazminę. Ryc. 3 obrazuje aktywność antyplazminy w osoczu krwi badanych gatunków zwierząt. Najwyższą aktywność stwierdzono w osoczu bydła, najniższą zaś u koni.

#### DYSKUSJA

Ciekawym zjawiskiem jest natychmiastowe hamowanie aktywności plazminy przez antyplazminę, gdy w mieszaninie reakcyjnej istnieje jeszcze substrat dla plazminy. Ta właściwość hamowania aktywności enzymu w maksymalnym stopniu w obecności jego substratu jest zjawiskiem unikatowym w obrębie inhibitorów proteaz w osoczu.

Hamowanie aktywności proteaz, w tym plazminy przez antyplazminę, jest reakcją dwustopniową, w której szybkie utworzenie odwracalnego kompleksu enzym-inhibitor poprzedza utworzenie innego, nieodwracalnego już kompleksu (6, 20). Kwas  $\epsilon$ -aminokapronowy hamował stopień natychmiastowej inhibicji





Ryc. 3. Aktywność antyplazminy w osoczu badanych gatunków zwierząt ( $\Delta E_{405}$ ). Wartości średnie  $\pm$  S.D.  
 Antiplasmin activity in plasma of species investigated ( $\Delta E_{405}$ ). Mean  $\pm$  S.D.

plazminy (ryc. 2). Podobne zjawisko obserwowano w przypadku L-lizyny (6). Krzywa hamowania sugeruje, że kwas  $\epsilon$ -aminokapronowy wpływa na pierwszy stopień reakcji, w czasie którego powstaje odwracalny kompleks plazmina-antyplazmina. Przypuszcza się, że kwas  $\epsilon$ -aminokapronowy powoduje zmiany w fizykochemicznych właściwościach cząsteczki enzymu (1, 5, 28).

W badanym czasie inkubacji stale obserwowano aktywność amidolityczną. Podobne zjawisko notowali też G a l l i m o r e i wsp. (11), którzy używali innego substratu chromogenego, p-nitroanilidu tosylo-glicylo-prolilo-lizyny. Jest to spowodowane powstawaniem kompleksu  $\alpha_2$ -makroglobulina-plazmina, który podobnie jak kompleks  $\alpha_2$ -makroglobulina-kalikeina (2) posiada aktywność amidolityczną względem małych substratów peptydowych (14). Tak więc możliwie krótki czas inkubacji (20 sek.) konieczny jest do oznaczenia wyłącznie aktywności antyplazminy. W piśmiennictwie spotkano tylko wcześnie prace dotyczące aktywności antyplazminy u zwierząt (19). Z uwagi jednak na stosowaną metodę, nie można ustalić, jakiego właściwie inhibitora aktywność była mierzona.

Wyniki prezentowane w niniejszej pracy sugerują, że syntetyczny substrat chromogeny S-2251 może znaleźć zastosowanie w oznaczaniu aktywności antyplazminy w osoczu krwi zwierząt gospodarskich.



## WNIOSKI

1. Najwyższą aktywność antyplazminy stwierdzono w osoczu bydła ( $23,3 \pm 2,0 \Delta E_{405}$ ), najniższą zaś u koni ( $10,2 \pm 0,4 \Delta E_{405}$ ).
2. Substrat chromogenny S-2251 może znaleźć zastosowanie w oznaczaniu aktywności antyplazminy w osoczu krwi zwierząt gospodarskich.

## PIŚMIENNICTWO

1. Abiko Y., Iwamoto M., Tomikawa M.: Plasminogen-plasmin system. V. A stoichiometric equilibrium complex of plasminogen and a synthetic inhibitor. *Biochim. Biophys. Acta* **185**, 424, 1969.
2. Amundsen E., Svendsen L., Vennerød A. M., Laake K.: Determination of plasma kallikrein with a new chromogenic tripeptide derivative. [W:] *Chemistry and Biology of the Kallikrein-kinin System in Health and Disease* (Pisano J.J., Austen K.F., red.), DHEW Publications, Washington 1976, s. 215.
3. Aoki N., Moroi M., Matsuda M., Tachiy K.: The behavior of 2-plasmin inhibitor in fibrinolytic states. *J. Clin. Invest* **60**, 361, 1977.
4. Aoki N., Moroi M., Tachiy K.: Effect of 2-plasmin inhibitor on fibrin clot lysis. Its comparison with 2-macroglobulin. *Thromb. Haemost.* **39**, 22, 1978.
5. Brockway W.J., Castellino F.J.: Measurement of the binding of antibrinolytic amino acids of various plasminogens. *Arch. Biochem. Biophys.* **151**, 194, 1972.
6. Christensen U., Clemmensen I.: Kinetic properties of the primary inhibitor of plasmin from human plasma. *Biochem. J.* **163**, 389, 1977.
7. Collen D.: Identification and some properties of new fast-acting plasmin inhibitor in human plasma. *Eur. J. Biochem.* **69**, 209, 1976.
8. Crawford G.P.M., Ogston D., Douglas A.S.: The contribution of plasma protease inhibitors to antiplasmin activity in man. *Clin. Sci. Mol. Med.* **51**, 215, 1976.
9. Edy J., DeCock F., Collen D.: Inhibition of plasmin by normal and antiplasmin-depleted human plasma. *Thromb. Res.* **8**, 513, 1976.
10. Gallimore M.J.: Serum inhibitors of fibrinolysis. *Br. J. Haematol* **31**, 217, 1975.
11. Gallimore M.J., Amundsen E., Aasen A.O., Larsbraaten M., Lyngaas K., Svendsen L.: Studies on plasma antiplasmin activity using a new plasmin-specific chromogenic tripeptide substrate. *Thromb. Res.* **14**, 51, 1979.
12. Granrot P.D.: Inhibition of plasmin activity by 2-macroglobulin. *Clin. Chim. Acta* **16**, 328, 1967.
13. Harpel P.C.: Plasmin inhibitor interactions: the effectiveness of 2-plasmin inhibitor in the presence of 2-macroglobulin. *J. Exp. Med.* **146**, 1033, 1976.
14. Harpel P.C., Mosesson M.W.: Degradation of human fibrinogen by plasma 2-macroglobulin enzyme complexes. *J. Clin. Invest.* **52**, 2175, 1973.
15. Highsmith R.F., Rosenberg R.D.: The inhibition of human plasmin by human antithrombin-heparin cofactor. *J. Biol. Chem.* **249**, 4335, 1974.
16. Ledwożyw A., Jabłonka S., Tusińska E., Herbut M.: The estimation of factor VII in livestock plasma by the use of tripeptide chromogenic substrate. *Arch. Vet. Pol.* **33**, 123, 1993.
17. Ledwożyw A., Jabłonka S., Tusińska E., Herbut M.: The estimation of factor VIII levels in horses, cattle, sheep and pig plasma by the use of synthetic chromogenic substrate. *Arch. Vet. Pol.* **33**, 275, 1993.
18. Ledwożyw A., Jabłonka S., Tusińska E., Herbut M.: Assay for endogenous heparin in plasma of livestock using a synthetic chromogenic substrate. *Arch. Vet. Pol.* **33**, 269, 1993.



19. Lewis J. H., Ferruson J. H.: Studies on a proteolytic enzyme system of the blood. I. Inhibition of fibrinolysis. *J. Clin. Invest.* **29**, 486, 1950.
20. Moroi M., Aoki N.: On the interaction of 2-plasmin inhibitor and proteases. *Biochim. Biophys. Acta* **482**, 412, 1977.
21. Moroi M., Aoki N.: On the interaction of 2-plasmin inhibitor levels in liver disease. *Clin. Chim. Acta* **84**, 99, 1978.
22. Mullertz S.: Molecular forms of plasmin and protease inhibitors in human fibrinolytic postmortem plasma. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* **30**, 369, 1972.
23. Mullertz S., Clemmensen I.: The primary inhibitor of plasmin human plasma. *Biochem. J.* **159**, 545, 1976.
24. Naito K., Aoki N.: Assay of 2-plasmin inhibitor activity by means of plasmin-specific tripeptide substrate. *Thromb. Res.*, **12**, 1147, 1978.
25. Norman P. S., Hill B. M.: Studies of the plasmin system. III. Physical properties of two plasmin inhibitors in plasma. *J. Exp. Med.* **108**, 639, 1958.
26. Ratnoff O.D., Pensky J., Ogston D., Naff G.B.: The inhibition of plasmin, plasma kallikrein, plasma permeability factor and C1r subcomponent of the first component of complement by serum C1-esterase inhibitor. *J. Exp. Med.* **129**, 315, 1969.
27. Shamash Y., Rimón A.: The plasmin inhibitors of human plasma. III. Purification and partial characterization. *Biochim. Biophys. Acta* **121**, 35, 1966.
28. Sojoholm I., Wiman B., Wallen P.: Studies on the conformational changes of plasminogen induced during activation to plasmin and by 6-aminohexanoic acid. *Eur. J. Biochem.* **39**, 471, 1973.
29. Teger-Nilsson A. C., Friberger P., Gyzander E.: Determination of a new rapid plasmin inhibitor in human blood by means of a plasmin-specific tripeptide substrate. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* **37**, 403, 1977.
30. Telesforo P., Semerara N., Verstrete M., Collen D.: The inhibition of plasmin by antithrombin III - heparin complex *in vitro* in human plasma and during streptokinase therapy in man. *Thromb. Res.* **7**, 669, 1975.
31. Wiman B., Collen D.: Purification and characterization of human antiplasmin, the fast acting plasmin inhibitor in plasma. *Eur. J. Biochem.* **78**, 19, 1977.

## SUMMARY

The level of antiplasmin in horse, cattle, sheep and pig plasma was investigated using the synthetic chromogenic substrate S-2251. The highest level of antiplasmin was stated in cattle plasma, the lowest one in horse plasma.

The synthetic substrate S-2251 (H-D-valyl-leucyl-lysyl-p-nitroanilide) is fully valuable in antiplasmin estimation in veterinary haematology.