

Katedra Patofizjologii AR i Zakład Fizjologii Człowieka AM w Lublinie

ANDRZEJ LEDWOŻYW, BARBARA BOROWICZ

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

The estimation of factor XII activity in livestock blood plasma

Aktywacja kontaktowa osocza krwi obejmuje oddziaływanie ujemnie naładowanych powierzchni fosfolipidowych z białkami krwi, zapoczątkowując proces krzepnięcia krwi, fibrynolizę i produkcję bradykininy. Ten zespół reakcji enzymatycznych często nazywany jest "drogą zależną od czynnika Hagemana", gdyż czynnik ten, rezydujący na ujemnie naładowanych powierzchniach fosfolipidowych płytek krwi, jest pierwszym aktywnym enzymem tej kaskady (13, 21). Po aktywacji czynnika XII dwufańcuchowy enzym proteolityczny, zwany czynnikiem XIIa aktywowany przez enzymy trypsynopodobne, jak plazmina (9), kalikreina (5), czy czynnik XIa (8), kininogen o wysokim ciężarze cząsteczkowym (HMW–kininogen), wraz z czynnikiem XI wiąże się z powierzchnią fosfolipidową płytek krwi, a czynnik XIIa reagując z tym kompleksem powoduje aktywację czynnika XI inicjując kaskadę krzepnięcia krwi (20).

Kompleks HMW–kininogen–peralikalikreina może reagować na powierzchni fosfolipidowej z czynnikiem XIIa, aktywując prekalikreinę do proteazy serynowej – kalikreiny, która może z kolei indukować cykliczny mechanizm aktywujący dodatkowe ilości czynnika XII lub działać na sam czynnik XIIa, generując rozpuszczalną formę tej proteazy serynowej (10).

Czynnik XIIa i XIa są proteazami serynowymi, można je więc oznaczać przy pomocy syntetycznych substratów oligopeptydowych (6, 17). Jednak, jak dotąd, możliwość szerokiego zastosowania oznaczeń tych czynników ograniczona jest nieznanością ich struktury i sekwencją aminokwasów, jaką atakują ich aktywne formy XIa i XIIa.

Celem niniejszej pracy było określenie przydatności syntetycznego substratu chromogennego, P-nitroanilidu H-D-prolilo-feniloalanylo-argininy, używanego do oznaczeń kalikreiny, do oznaczenia poziomów czynnika XII w osoczu krwi dużych zwierząt gospodarskich.

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 (ncb, 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 μ l) mieszano z 3 ml 0,05 M buforu Tris-HCl o pH 7,3. Krew pobierano przez nakłucie żyły jarmowej w przypadku koni, bydła i owiec oraz żyły brzożnej ucha w przypadku świń.

Czynnik XII obecny w próbce osocza aktywowany jest Cephotezem lub kaolinem do czynnika XIIa. Czynnik XIIa aktywuje obecną w próbce prekalikreinę do kalikreiny, ta zaś odszczepia p-nitroanilinę od syntetycznego substratu S-2203. Ilość odszczepionej p-nitroaniliny mierzy się spektrofotometrycznie przy długości fali 405 nm.

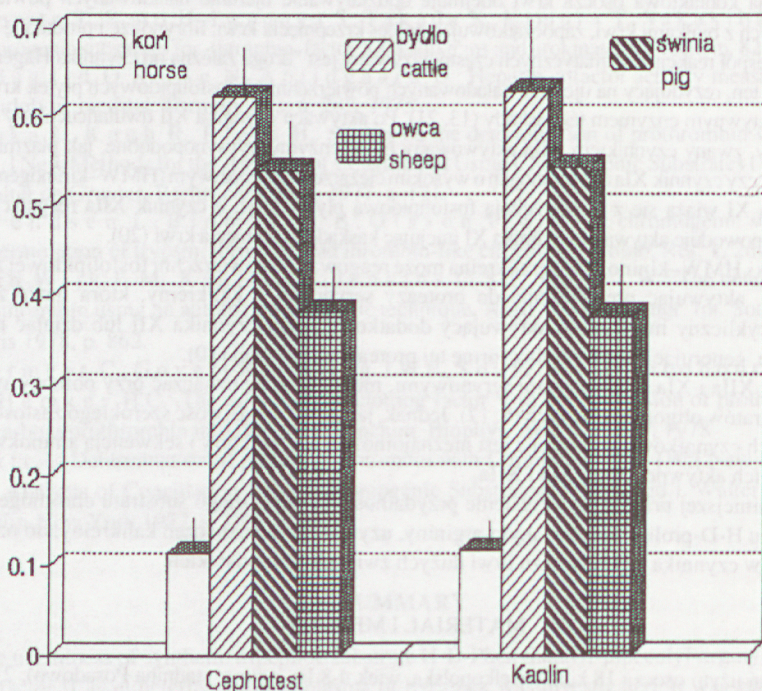
Zawiesinę kaolinu przygotowano dodając 500 mg kaolinu (E. Merek, Darmstadt, Niemcy) do 100 ml 0,145 M NaCl, zbuforowanego do pH 7,4 przy pomocy 0,15 M Tris-HCl. Czteromolowy roztwór substratu S-2203 (Kabi Vitrum, Molndal, Szwecja) przygotowano w 0,05 M buforze Tris-HCl o pH 7,8. Cephotez otrzymano z firmy Nyegaard, Oslo, Norwegia.

Do termostатовanej kuwety (37°C) spektrofotometru pipetowano 50 μ l badanego osocza, 50 μ l Cephotezu i po 3 min. inkubacji dodawano 400 μ l roztworu substratu i mierzono $\Delta E_{405}/\text{min}$.

W przypadku aktywacji osocza kaolinem, do 500 μ l osocza dodawano 500 μ l zawiesiny kaolinu. Po 3 min. inkubacji w 37°C kaolin odwirowywano przez 10 min. przy 2000 g i w kuwecie spektrofotometru mieszano 100 μ l aktywowanego osocza z 400 μ l roztworu S-2203 i mierzono $\Delta E_{405}/\text{min}$.

WYNIKI

Na ryc. 1 przedstawiono aktywność czynnika XII w aktywowanym Cephotezem i kaolinem osoczu krwi badanych gatunków zwierząt. Najwyższą aktywność badanego czynnika stwierdzono w osoczu bydła, najniższą zaś u koni.



Ryc. 1. Aktywność czynnika XII w osoczu koni, bydła, owiec i świń ($\Delta E_{405}/\text{min}$). Wartości średnie $\pm$ S.D.
Factor XII activity in horse, cattle, sheep and pig plasma ($\Delta E_{405}/\text{min}$). Mean $\pm$ S.D.

DYSKUSJA

Ostatnio poznano nowe szczegóły kontaktowej aktywacji mechanizmu krzepnięcia. Podczas aktywacji czynnika XII kaolinem powstaje czynnik XIIa₁, nie ulegający w tym procesie proteolizie. Większość tego czynnika pozostaje związana z powierzchnią cząsteczek kaolinu i może być usunięta wirowaniem (4). W dalszym etapie, pozostała w krążeniu część czynnika XIIa₁ ulega proteolizie, wywołując odszczepienie fragmentu zwanego czynnikiem XIIa₂. Proteolizę tę powodują ślady kalikreiny (1, 5) i plazminy (2, 9). Reakcję tę przyspiesza obecność śladowych ilości HMW-kininogenu (3, 24). Po aktywacji Cephotessem, którego nie można usunąć wirowaniem, pełną aktywność kalikreiny obserwowano przy 5% poziomie czynnika XIIa₁, zaś zależność liniowa między niedoborem czynnika XII a zmniejszeniem się generacji kalikreiny istnieje tylko wtedy, gdy poziom czynnika XII nie przekracza 1% (6).

Sytuacja ta różni się zasadniczo, gdy jako aktywatora używa się kaolinu. Po usunięciu kaolinu przez wirowanie, co jest niezbędne przed wykonaniem pomiarów fotometrycznych, krytyczny poziom czynnika XII wpływający na tworzenie się kalikreiny wynosi niewiele ponad 100%. Różnicę tę powoduje niewątpliwie czynnik XIIa₁, usuwany z kaolinem, a pozostający w mieszaninie aktywacyjnej podczas aktywacji Cephotessem. Istnieje więc ścisła zależność między aktywatorem a początkowym poziomem czynnika XII. Zaletą aktywacji kaolinem w tym układzie jest możliwość użycia nieaktywowanego, normalnego osocza jako źródła prekalikreiny i HMW-kininogenu. Nie jest to możliwe natomiast przy użyciu substancji aktywującej, której nie można oddzielić od osocza. Ilość HMW-kininogenu wymagana w reakcji między czynnikiem XIIa₂ a prekalikreiną jest znacznie mniejsza niż stężenie HMW-kininogenu w normalnym, nieaktywowanym osoczu. Jedyńm źródłem HMW-kininogenu w tym układzie jest rozcieńczone, badane osocze.

Dopiero przy najwyższych rozcieńczeniach osocza nie stwierdza się różnic w wynikach otrzymanych przy użyciu oczyszczonej prekalikreiny i dwóch innych źródeł tego proenzymu, które także zawierają HMW-kininogen. W doświadczeniach nad badaniem szybkości zanikania kalikreiny z osocza stwierdzono, że kalikreina dodana do nieaktywowanego, normalnego osocza nie powoduje aktywacji nieaktywnego czynnika XII ani prekalikreiny. Wyniki te są zgodne z rezultatami uzyskanymi przez Chan a i wsp. (4), którzy stwierdzili, że aktywacja prekalikreiny i czynnika XII przez kalikreinę zależna jest od aktywacji czynnika XII przez ujemnie naładowaną powierzchnię fosfolipidową. Nieaktywny czynnik XII nie ulega więc aktywacji po dodaniu kalikreiny do osocza. Dodanie kwasu ε-aminokapronowego do osocza jest konieczne, ponieważ substrat użyty w doświadczeniu rozszczepiany jest także przez plazminę, nie ma on natomiast wpływu na kalikreinę (16), podczas gdy aprotynina, inny szeroko stosowany inhibitor plazminy, hamuje też aktywność kalikreiny. Ponieważ antytrombina III zaktywowana przez heparynę nie hamuje powstawania kalikreiny (25), metodę tę stosować można także do próbek zawierających heparynę. Naturalne inhibitory kalikreiny, jak esteraza Cl (19), α₂-makroglobulina i α₁-antytrypsyna reagują szybko

z kalikreina (7). W celu zminimalizowania strat kalikreiny odczynniki są mieszane w kuwecie spektrofotometru, a reakcję rozpoczyna się w chwili dodania substratu, po optymalnym czasie preinkubacji. Wpływ trombiny, czynnika Xa i innych proteaz serynowych mogących odszczepiać p-nitroanilinę z substratu, można wyeliminować w równoległych oznaczeniach zawierających kwas ϵ -aminokapronowy. Mimo znacznego postępu w poznaniu mechanizmu aktywacji czynnika XII, nie jest jasny mechanizm powstawania jego centrum aktywnego (22). Proponuje się zmiany konformacyjne (12), odsłonięcie gotowego centrum aktywnego (21), czy istnienie w natywnym czynniku Hagemana wewnętrznej aktywności proteolitycznej (11, 26). Aktywność czynnika XII ulega obniżeniu we wstrząsie endotoksycznym (23) i po infuzji krystaloidów (15) czy trombiny (14), co można wyjaśnić działaniem mechanizmu sprzężenia zwrotnego. Aktywny czynnik XII obecny jest w osoczu krwi obwodowej w czasie odrzucania przeszczepu.

Wyniki niniejszej pracy sugerują, że syntetyczny substrat trójpeptydowy, p-nitroanilid H-D-prolilo-feniloalanylo-argininy może być z powodzeniem używany do oznaczania poziomu czynnika XII w osoczu krwi dużych zwierząt gospodarskich.

WNIOSKI

1. Syntetyczny substrat trójpeptydowy S-2203 może być z powodzeniem używany w hematologii weterynaryjnej do oznaczania poziomu czynnika XII w osoczu krwi dużych zwierząt gospodarskich.

2. Najwyższą aktywność badanego czynnika stwierdzono w osoczu bydła ($0,62 \Delta E_{405}/\text{min.}$), najniższą zaś u koni ($0,11 \Delta E_{405}/\text{min.}$)

PIŚMIENNICTWO

1. Bagdasarian A., Lahiri B., Colman R. W.: Origin of the high molecular weight activator of prekallikrein. *J. Biol. Chem.* **248**, 7742, 1973.
2. Burrowes C. E., Novat H. V., Soltay M. J.: The kinin system of human plasma. VI. The action of plasmin. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **138**, 959, 1971.
3. Chan J. Y. C., Burrowes C. E., Novat H. V.: Activation of factor XII. Enhancing effect of a potentiator. *Thromb. Res.* **10**, 309, 1977.
4. Chan J. Y. C., Habal F. M., Burrowes C. E., Novat H. V.: Interaction between factor XII (Hageman factor), high molecular weight kininogen and prekallikrein. *Thromb. Res.* **9**, 423, 1976.
5. Cochrane C. G., Revak S. D.: Activation of Hageman factor in solid and fluid phase. *J. Exp. Med.* **138**, 1564, 1973.
6. Egberg N., Bergstrom K.: Synthetic chromogenic substrates in the assay for plasma prekallikrein and coagulation factors II and X. [W:] Scully N.F., Kakkar V. V., (red.): *Chromogenic Peptide Substrates*. Churchill Livingstone, London 1979, s. 61.
7. Gallimore M. J., Aasen A. O., Lyngaas K. H. N., Lansbraaten M., Amundsen E.: Falls in plasma levels of prekallikrein, high molecular weight kininogen and kallikrein inhibitors during lethal endotoxin shock in dogs. *Thromb. Res.* **12**, 307, 1978.

8. Griffin J. J.: Role of surface in surface-dependent activation of Hageman factor (blood coagulation factor XII). *Proc Natl. Acad. Sci. USA* **75**, 1998, 1978.
9. Kaplan A. P., Austen K. F.: A prealbumin activator of prekallikrein. II. Derivation of activators of prekallikrein from active Hageman factor with plasmin. *J. Exp. Med.* **133**, 672, 1971.
10. Kaplan A. P., Austen K. F.: A prealbumin activator of prekallikrein. *J. Immunol.* **105**, 802, 1970.
11. Kurachi K., Fugikawa K., Davie E. W.: Mechanism of activation of bovine factor XI by factor XII and factor IIIa. *Biochemistry* **19**, 1330, 1980.
12. McMillin C. R., Saito H., Ratnoff O. D., Walton A. G.: The secondary structure of human factor XII (Hageman factor) and its alteration by activating agents. *J. Clin. Invest.* **54**, 1312, 1974.
13. Murano G.: The Hageman connection: interrelationships of blood coagulation, fibrin(ogen)olysis, kinin generation and complement activation. *Am. J. Hematol.* **4**, 409, 1978.
14. Muller-Berghaus G., Ehlers E., Kaufer P.: Das Verhalten der oberflächensensiblen Gerinnungsfaktoren XII und XI bei intravasaler Gerinnung. *Verh. Dtsch. Ges. Inn. Med.* **80**, 1458, 1974.
15. Muller-Berghaus G., Lasch H. B.: Consumption of Hageman factor activity in the generalized Schwartzman reaction induced by liquid. *Thromb. Diath. Haemorrh.* **23**, 386, 1970.
16. Nakahara M.: Effects of t-AMCHA and EACA on the plasma kallikrein system. *Thromb. Haemost.* **37**, 104, 1977.
17. Ohishi S., Katori M.: Fluorometric assay for plasma prekallikrein using peptidylmethylcoumarinyl-amide as a substrate. *Thromb. Res.* **14**, 551, 1979.
18. Ratnoff O. D., Davis E. W., Mallet D. L.: Studies on the action of Hageman factor: evidence that activated Hageman factor in turn activates plasma thromboplastin antecedent. *J. Clin. Invest.* **40**, 803, 1961.
19. Ratnoff O. D., Pensky J., Ogston D., Naff G. B.: The inhibition of plasmin, plasma kallikrein, plasma permeability factor and the Clr subcomponent of the first component of complement by serum C1 esterase inhibitor. *J. Exp. Med.* **129**, 315, 1969.
20. Ratnoff O. D., Rosenblum J. M.: Role of Hageman factor in the initiation of clotting by glass. Evidence that glass frees Hageman factor from inhibition. *Am. J. Med.* **25**, 160, 1958.
21. Ratnoff O. D., Saito H.: Amidolytic properties of single-chain activated Hageman factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **76**, 1461, 1979.
22. Revak S. D., Cochrane C. G., Bowman B. M., Griffin J. H.: Surface and fluid phase activation of two forms of activated Hageman factor produced during contact activation of plasma. *J. Exp. Med.* **147**, 719, 1978.
23. Rodriguez-Erdmann F.: Studies on the pathogenesis of the generalized Schwartzman reaction. III. Trigger mechanism for the activation of the prothrombin molecule. *Thromb. Diath. Haemorrh.* **23**, 386, 1970.
24. Stormorken H., Baklund A., Gallimore M., Ritland S.: Chromogenic substrate assay of plasma kallikrein. *Haemostasis* **7**, 69, 1978.
25. Vennerød A. M., Laake K., Solberg A. K., Stromland S.: Inactivation and binding of human plasma kallikrein by antithrombin III and heparin. *Thromb. Res.* **9**, 457, 1976.
26. Wiggins R. C., Cochrane C. G.: The autoactivation of rabbit Hageman factor. *J. Exp. Med.* **150**, 1122, 1980.

SUMMARY

The level of factor XII in horse, cattle, sheep and pig plasma was estimated using synthetic tripeptide substrate, H-D-prolyl-phenylalanyl-arginyl-p-nitroanilide. The highest level of this factor was found in cattle plasma, the lowest one in horse plasma.

This substrate is fully valuable in factor XII determination in the plasma of livestock.