

Ocena działania podchlorynu i nadtlenoazotynu na wybrane elementy układu hemostazy

STRESZCZENIE

Fibrynogen i plazminogen to kluczowe białka hemostazy, która zapewnia płynność krwi oraz zapobiega jej utracie, jeśli nastąpi przerwanie ciągłości naczyń krwionośnych. Białka te są narażone na działanie RFT i RFA, ulegają licznym modyfikacjom oksydacyjnym. Przekłada się to na zmianę ich struktury trzeciorzędowej, funkcji biologicznych oraz prowadzi do zaburzenia równowagi między układem krzepnięcia i fibrynolizą, a w konsekwencji dochodzi prawdopodobnie do rozwoju chorób układu sercowo-naczyniowego, m.in. zakrzepicy.

Celem prowadzonych badań było (1) określenie wpływu modyfikacji Fg i Plg, indukowanych przez OCI^- i ONOO^- na właściwości prozakrzepowe, fizyko-chemiczne i lityczne fibryny oraz aktywność amidolityczną Plm. Dodatkowym zadaniem (2) było opracowanie warunków metody immunoenzymatycznej do oznaczenia stężenia znitrowanego Fg w osoczu. Ten prosty test w przyszłości może stać się niezawodnym narzędziem, wykorzystywanym w badaniach przesiewowych do określenia poziomu ryzyka rozwoju zakrzepicy. Dodatkowo (3) poszukiwano i wyselekcjonowano związki, których zadaniem była ochrona antyoksydacyjna badanych białek przed wpływem OCI^- i ONOO^- . W badaniach wykorzystywano wybrane polifenole oraz nitroksydy.

Badane oksydanty zmieniały strukturę trzeciorzędową Fg, prowadząc do tworzenia agregatów HMW, nie wpływały natomiast na obraz elektroforetyczny Plg. Ponadto powodowały tworzenie w obu białkach markerów stresu oksydacyjnego, takich jak: grupy karbonylowe, 3-nitrotyrozyny, dityrozyny, utlenianie reszt Trp. OCI^- niemalże całkowicie hamował proces polimeryzacji monomerów fibryny, ONOO^- wykazywał słabsze działanie. W konsekwencji powstawał włóknik o patologicznych, prozakrzepowych właściwościach, zbudowany z cienkich, ściśle upakowanych włókien. Efekt hamujący OCI^- na konwersję plazminogenu do plazminy był silniejszy niż ONOO^- . Fg to białko altruistyczne, przejmujące na siebie atak RFT. W badaniach potwierdzono, że jest ono bardziej podatne na modyfikacje niż Plg. W największym stopniu zmianom ulegał łańcuch A α Fg. Stosowane polifenole chroniły zarówno Fg, jak i Plg przed wpływem oksydantów. Silniejsze działanie ochronne (-)-epikatechiny obserwowano w próbach z OCI^- , natomiast kwercetyny w próbach z ONOO^- . Nitroksydy zapobiegały modyfikacjom indukowanym przez ONOO^- , nie chroniąc badanych białek przed wpływem OCI^- . Najsilniej spośród badanych nitroksydów w próbach z Fg działał TEMPO. W próbach z Plg najsilniejsze działanie ochronne wykazywał 4-Acetamido-TEMPO.

Justyna Motack

Evaluation of the hypochlorite and peroxynitrite action on selected elements of hemostasis system

ABSTRACT

Fibrinogen and plasminogen are the key hemostasis proteins. Hemostasis provides blood flow and prevents it from losing as a result of injury. These proteins are exposed to reactive oxygen and nitrogen species, undergoing numerous oxidative modifications. Oxidative modifications lead to change their structures, biological functions, and imbalances between the coagulation system and fibrinolysis. As a consequence of these changes, cardiovascular diseases are developed, such as thrombosis.

The aim of the study was (1) to determine the effect of Fg and Plg modifications, induced by OCl^- and ONOO^- , on pro-thrombotic, biochemical and lytic properties of fibrin and amidolytic activity of Plm. Additional goal (2) was to develop conditions an enzyme-linked immunosorbent assay to determine the concentration of nitrated fibrinogen in plasma. This simple test can become a reliable tool used in screening study to determine the risk of thromboembolic complications in the future. In addition, (3) my aim was to find and select antioxidant compounds, that protect Fg and Plg against OCl^- and ONOO^- action. Polyphenols and nitroxides were used in the studies.

Oxidants altered the Fg structure, leading to formation of HMW aggregates, but did not affect on the Plg structure. In addition, OCl^- and ONOO^- generated oxidative stress markers in both proteins, such as: carbonyl proteins, 3-nitrotyrosine, dityrosine, tryptophan residues modifications. Hypochlorite almost completely inhibited polymerization of fibrin monomers, ONOO^- has a weaker effect. The resulting, fibrin clot has pathological, pro-thrombotic properties. It consists of thin, tightly packed fibrin fibers. OCl^- inhibited the conversion of plasminogen to plasmin stronger than ONOO^- . Fg is more susceptible to oxidative attack, than Plg. The fibrinogen A α chain is most vulnerable to change. Polyphenols protect both proteins from oxidative modifications. (-)-Epicatechin had a stronger protein-protecting effect against hypochlorite action and quercetin against peroxynitrite action. Nitroxides protected proteins only against ONOO^- actions. The TEMPO protected fibrinogen most effectively against the effects of peroxynitrite. In tests with Plg, the most protective effect was 4-Acetamido-TEMPO.

Josyane Motocok