

Научно-исследовательский институт биомедицинской химии имени В.Н.Ореховича

Архив журнала

## Вопросы медицинской химии

*ISSN 0042-8809*

1985

**Внимание!** Распознавание текста проведено в автоматическом режиме для облегчения работы поисковых систем. Будьте внимательны при копировании, возможны ошибки и неточности. Используйте сканированный графический вариант.

Archive of journal

## Voprosy meditsinskoï khimii

*ISSN 0042-8809*

1985

**Attention!** OCR has been performed automatically for search engines only. Be careful when copying, errors are possible. Use scanned picture as standard.

<http://pbmc.ibmc.msk.ru>

ТОМ XXXI

ВЫПУСК 5

СЕНТЯБРЬ — ОКТЯБРЬ

Двухмесячный научно-теоретический журнал

Основан в 1955 г.

ВОПРОСЫ  
МЕДИЦИНСКОЙ  
ХИМИИ



МОСКВА. МЕДИЦИНА. 1985



РЕДАКЦИОННАЯ КОЛЛЕГИЯ:

Главный редактор С. С. ДЕБОВ

В. И. МАЗУРОВ (зам. главного редактора), Т. Т. БЕРЕЗОВ, Е. Н. ГЕРАСИМОВА, В. З. ГОРКИН, И. Б. ЗБАРСКИЙ, А. Н. КЛИМОВ, Б. Ф. КОРОВКИН, Л. А. ЛОКШИНА, В. Н. ОРЕХОВИЧ, Л. Ф. ПАНЧЕНКО, М. Ш. ПРОМЫСЛОВ, Е. Л. РОЗЕНФЕЛЬД, Ю. А. РОМАКОВ (ответственный секретарь), В. А. САКС, С. Е. СЕВЕРИН, В. Б. СПИРИЧЕВ

РЕДАКЦИОННЫЙ СОВЕТ:

БАЕВ А. А. (Москва)	ТРОИЦКИЙ Г. В. (Симферополь)
БЕЛИЦЕР В. А. (Киев)	ТАРАҚУЛОВ Я. Х. (Ташкент)
БЫЧКОВ С. М. (Москва)	ТЯХЕПЫЛЬД Л. Я. (Тарту)
КОНСТАНТИНОВ А. А. (Хабаровск)	УТЕВСКИЙ А. М. (Харьков)
КУДРЯШОВ Б. А. (Москва)	ШАПОТ В. С. (Москва)
ЛЯХОВИЧ В. В. (Новосибирск)	ЯКОВЛЕВ Н. Н. (Ленинград)
ПАСХИНА Т. С. (Москва)	ЯСАЙТИС А. А. (Вильнюс)

Адрес редакции журнала:

Москва, Солянка, 14

АМН СССР

Тел. 297-16-44

Зав. редакцией Л. А. Фирсова

1983

## ВЫДЕЛЕНИЕ ИНГИБИТОРА САМОСБОРКИ ФИБРИНА ИЗ ПЛАЗМЫ КРОВИ И ЭКСТРАКТОВ ТКАНЕЙ

Кафедра биохимии медицинского института, Тюмень

Ранее мы обнаружили в плазме (сыворотке) крови человека и ряда животных, а также в тканях животных ингибитор самосборки фибрина [2—4], который отличается по ряду свойств от обладающих антиполимеризационной активностью фрагментов D и комплексов генарипа с прокоагулянтами [10]. Торможение самосборки обусловлено свойством ингибитора образовывать комплексы с мономерным и олигомерным фибрином за счет электростатических взаимодействий [5, 9]. Изменения содержания ингибитора в тканях и крови при воздействиях, угнетающих или активирующих тромбиногенез, свидетельствуют о его регуляторной роли в гемостазе [8].

В настоящей работе описаны приемы выделения из плазмы и тканевых экстрактов гомогенного ингибитора самосборки фибрина.

### Методика

Активность ингибитора в плазме, экстрактах тканей и других материалах, получаемых в процессе выделения, определяли по их влиянию на скорость самосборки в системе 0,4 мл 0,075 М боратного буфера pH 7,6 — 0,1 мл 0,14 М раствора хлорида натрия — 0,1 мл 0,03% раствора мономерного фибрина. Заменяя раствор хлорида натрия на исследуемый материал, устанавливали его влияние на скорость самосборки (величина, обратная продолжительности, измеряется в с<sup>-1</sup>). Эффективность торможения рассчитывали по формуле  $i = 1 - V_0/V_K$ , где  $V_0$  и  $V_K$  — скорость самосборки в опыте и контроле соответственно. Количество ингибитора выражали в условных единицах активности (ЕА) с помощью калибровочного графика [4]. Гомогенность препаратов ингибитора контролировали методом тонкослойной хроматографии на бумаге FN-11 в системе бутанол — ледяная уксусная кислота — вода в соотношениях 1 : 1 : 5 и 4 : 1 : 4 (обе смеси пропускали двукратно). Гидролиз гомогенного ингибитора проводили, как описано ранее [6]. Аминокислотный состав гидролизатов устанавливали методом хроматографии на бумаге FN-11 и на пластинках «Фиксион» 50×8, электрофореза на бумаге FN-12 и комбинацией электрофореза и хроматографии [6].

Для определения молекулярной массы использовали гель-фильтрацию через колонку (сефадекс G-50, 10×400 мм, скорость потока 20 мл/ч), калиброванную рибофлавином, окси-

тоцином, цианокобаламином, цитохромом c и трипсином.

Мономерный фибрин выделяли из бычьей плазмы [7]. Кровь и органы брали у наркотизированных животных (белые крысы), перфузируя сосудистую систему после отбора пробы крови 0,14 М раствором хлорида натрия до обесцвечивания оттекающей жидкости. Ткани гомогенизировали (250 мг в 1 мл 0,14 М раствора хлорида натрия, стеклянный гомогенизатор, 2000 об/мин), гомогенат разбавляли тем же растворителем в 10 раз и освобождались от грубых частиц центрифугированием (8000 г, 25 мин).

### Результаты и обсуждение

Путем изменения продолжительности диализа, соотношения диализата и геля, pH и ионной силы элементов была найдена совокупность условий, позволяющих получить достаточно очищенный препарат ингибитора самосборки фибрина [1]:

1) 0,5 л цитратной плазмы крови (3,8%, 1 : 9) дефибрируют нагреванием (56 °С, 10 мин) и центрифугированием (1,250 g, 15 мин);

2) дефибрированную плазму диализуют через купрофан (мембрана гидратцеллюлозная для гемодиализа) против дистиллированной воды (1 : 2), меняя воду 5 раз через каждые 4 ч. Диализат выпаривают на кипящей водяной бане до объема 50 мл;

3) сконцентрированный диализат смешивают с 180—200 мл геля ДЭАЭ-сефадекса А-25, экспонированного не менее 6 ч в 0,05 М аммонийно-ацетатном буфере pH 7,6 и помещивают при комнатной температуре 30 мин. Полученной смесью заполняют стеклянную колонку (15××500 мм);

4) после сформирования столбика геля через колонку пропускают последовательно по 300 мл 0,05 и 0,10 М, а затем 800 мл 0,15 М аммонийно-ацетатного буфера pH 7,6. При пропускании последнего буфера элюат собирают порциями по 10 мл и определяют в каждой содержание ингибитора;

5) фракции, содержащие ингибитор, объединяют, летучий буфер удаляют выпариванием на кипящей водяной ба-

не, сухой остаток растворяют в необходимом количестве дистиллированной воды (не менее 5 мл) и отделяют центрифугированием нерастворившиеся частицы. В растворе содержится ингибитор самосборки фибрина —  $28\ 000 \pm \pm 930$  ЕА из 1 л плазмы (около 100% исходного содержания).

Молекулярная масса ингибитора из плазмы крови крысы, по данным гель-фильтрации, составляет  $1294 \pm 36$  D, из плазмы человека —  $1750 \pm 100$  D. Препараты ингибитора из плазмы крови человека или крысы содержат следовые количества серина и аспарагиновой кислоты. Порознь и в смеси эти аминокислоты (0,1%) не влияют на самосборку и, следовательно, не препятствуют использованию препарата ингибитора для изучения кинетики торможения самосборки и биологических свойств ингибитора.

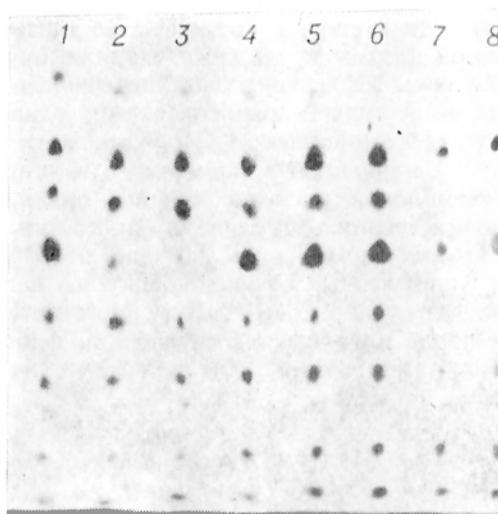
Выделение из плазмы крови гомогенного препарата ингибитора самосборки осуществляют следующим образом:

1) плазму крови, дефибринированную, как описано выше, диализуют через целлофан Т-100 против дистиллированной воды, меняя воду 4 раза через каждые 4 ч. Диализат концентрируют примерно до  $\frac{1}{5}$  исходного объема плазмы. Поскольку средний размер пор у целлофана Т-100 меньше, чем у купрофана, диализат более полно освобождается от высокомолекулярных соединений и не содержит веществ с характерным для белков спектром поглощения. Это позволяет исключить ионообменную хроматографию и сразу приступить ко второму этапу;

2) сконцентрированный диализат (2 мл на колонку  $10 \times 400$  мм) вносят в колонку, заполненную гелем сефадекса G-15, уравновешенную 0,05 M аммонийно-ацетатным буфером рН 7,6, и промывают колонку этим же буфером, собирая элюат порциями по 2 мл и определяя в каждой из них содержание ингибитора;

3) ингибиторсодержащие порции элюата объединяют и освобождают от буфера выпариванием на кипящей водяной бане. Раствор сухого остатка в воде представляет собой целевой продукт. Если в его составе при хроматографии на бумаге обнаруживаются примеси, следует повторить гель-фильтрацию на колонке с сефадексом G-15.

Чтобы избежать необходимости повторения, следует после первой гель-



Хроматограмма гидролизатов ингибитора самосборки фибрина (на бумаге FN-11), выделенного из плазмы крови и исследуемых тканей белых крыс.

1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 и 8 — гидролизаты ингибитора из головного мозга, легких, сердца, печени, почки, селезенки, мышцы бедра и плазмы крови соответственно.

фильтрации подвергнуть бумажной хроматографии все ингибиторсодержащие фракции элюата и объединить те из них, которые не содержат примесей. В этом случае выход ингибитора составляет 18–27% от исходного содержания в плазме. Повторной гель-фильтрацией его можно повысить до 45–50%.

Ингибитор может быть получен и из экстракта тканей. При этом гомогенат ткани разбавляют в 10 раз и подвергают такой же обработке, как и плазму крови по первому или второму описанному выше вариантам. С помощью второй совокупности приемов мы получили из тканей головного мозга, легких, сердца, печени, почки, селезенки, мышцы бедра и плазмы крови белых крыс ингибитор с молекулярной массой 1294 D. Идентичность ингибиторов плазмы крови различных тканей подтверждена также анализом аминокислотного состава гидролизатов, полученных из гомогенных препаратов ингибитора, выделенного из плазмы крови крысы и каждой из перечисленных выше тканей. Во всех случаях в составе гидролизатов при хроматографии на бумаге обнаруживали 9 пятен с одинаковыми величинами скорости миграции (см. рисунок). Хроматография на пластинках «Фикснор»  $50 \times 8$ , электрофорез на бумаге FN-11 и комбинация электрофореза на бумаге с хроматографией позволили устано-

вить, что в составе гидролизатов ингибитора плазмы крови крыс, а также ингибиторов выделенных из перечисленных выше тканей крыс содержатся одни и те же аминокислоты: аланин, аргинин, аспарагиновая кислота, валин, глутаминовая кислота, лейцин, лизин, пролин, серин, фенилаланин и цистин.

Таким образом, при помощи второй из приведенных выше совокунностей приемов удается выделить гомогенный препарат ингибитора самосборки фибрина, пригодный для аналитических целей.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. *Бышевский А. Ш., Чиряшев Е. А.* — Способ получения ингибитора полимеризации фибрина — А. с. 1044274 (СССР).
2. *Бышевский А. Ш., Чиряшев Е. А.* — В кн.: Механизмы регуляции обмена веществ в норме и патологии. Свердловск, 1982, с. 104—109.
3. *Бышевский А. Ш., Чиряшев Е. А.* — В кн.: Система регуляции агрегатного состояния крови в норме и патологии. М., 1982, с. 89—93.
4. *Бышевский А. Ш., Чиряшев Е. А.* — Укр. биохим. журн., 1983, т. 55, № 3, с. 260—265.
5. *Бышевский А. Ш., Чиряшев Е. А.* — Вopr. мед. химии, 1983, № 5, с. 22—27.

УДК 616.127-005.8-07:616.831-008.939.43-02:613.863

*Ф. З. Меерсон, А. Д. Дмитриев, В. И. Заяц, И. И. Рожницкая, Е. А. Кизим*

### ВЛИЯНИЕ СТРЕССА, ИНФАРКТА И АДАПТАЦИИ К КОРОТКИМ СТРЕССОРНЫМ ВОЗДЕЙСТВИЯМ НА СОДЕРЖАНИЕ ОПИОИДНЫХ ПЕПТИДОВ В ГОЛОВНОМ МОЗГЕ

Институт общей патологии и патологической физиологии АМН СССР, Всесоюзный научный центр психического здоровья АМН СССР, Москва

Открытие опиоидных пептидов в головном мозге оказалось возможным на основе общей идеи о наличии в нем ранее установленных фармакологами опиатных рецепторов, связанных с существованием эндогенных лигандов, по химической структуре и действию подобных морфию и играющих важную роль в регуляции функций мозга [4]. Однако даже после установления химической структуры и распределения в мозге эндорфинов и энкефалинов [2, 6] вопрос об их роли в конкретных физиологических реакциях организма остается во многом нерешенным. Так, например, известно, что  $\beta$ -эндорфин и энкефалины выделяются в кровь при стрессе [5] и при определенных стрессорных ситуациях могут

6. *Дэвени Т., Гергей Я.* Аминокислоты, пептиды и белки. М., 1976.
7. *Мухачева Н. А., Бышевский А. Ш.* — Биохимия, 1979, т. 44, № 11, с. 1944—1951.
8. *Умутбаева М. К.* — В кн.: Механизмы регуляции обмена веществ в норме и патологии. Свердловск, 1982, с. 95—98.
9. *Чиряшев Е. А.* Новый циркулирующий ингибитор самосборки фибрина. Автореф. дис. канд. Челябинск, 1983.
10. *Чиряшев Е. А., Левен П. И.* — В кн.: Актуальные вопросы теории и практики медицины. Тюмень, 1981, с. 38—38.

Поступила 23.02.84

#### ISOLATION OF INHIBITOR OF THE FIBRIN SELFASSOCIATION FROM BLOOD PLASMA AND TISSUE EXTRACTS

*A. Sh. Byshevskiy, E. A. Chiryal'ev, M. K. Umutbaeva*

Chair of Biochemistry, Medical School, Tyumen

Procedures for isolation of an inhibitor of the fibrin selfassociation are described. The procedures involved dialysis across cuprophane or cellophane T-100, ion exchange chromatography (the first method) or gel filtration (the second method). The product containing amino acid impurities was obtained after dialysis across cuprophane and ion exchange chromatography; a homogenous inhibitor was isolated by means of dialysis across cellophane T-100 and gel filtration through Sephadex G-50.

накапливаться в тканях мозга [2]. Однако неясно, как изменяется содержание этих опиоидных пептидов в тканях мозга при адаптации к повторным стрессорным воздействиям. Между тем вопрос этот представляет существенный интерес для понимания физиологической роли указанных пептидов в организме, так как известно, что такого рода адаптация к стрессорным воздействиям может предупреждать повреждения сердца и других органов при длительном стрессе и ограничивать нарушения сократительной функции сердца при инфаркте миокарда [3].

В соответствии с изложенным целью настоящей работы состояла в определении содержания  $\beta$ -эндорфина и энкефалинов