

Архив журнала

## Вопросы медицинской химии

*ISSN 0042-8809*

1989 том 35 выпуск 3

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

## Voprosy meditsinskoï khimii

The journal archive

*ISSN 0042-8809*

1989 volume 35 issue 3

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

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

ТОМ 35

ВЫПУСК 3

МАЙ — ИЮНЬ

Двухмесячный научно-теоретический журнал

Основан в 1955 г.

# ВОПРОСЫ МЕДИЦИНСКОЙ ХИМИИ



МОСКВА · МЕДИЦИНА · 1989



## РЕДАКЦИОННАЯ КОЛЛЕГИЯ:

Главный редактор С. С. ДЕБОВ

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

## РЕДАКЦИОННЫЙ СОВЕТ:

БАЕВ А. А. (Москва)

БЕЛИЦЕР В. А. (Киев)

БЫЧКОВ С. М. (Москва)

КОНСТАНТИНОВ А. А. (Хабаровск)

КУДРЯШОВ Б. А. (Москва)

ЛЯХОВИЧ В. В. (Новосибирск)

ПАСХИНА Т. С. (Москва)

ТРОИЦКИЙ Г. В. (Симферополь)

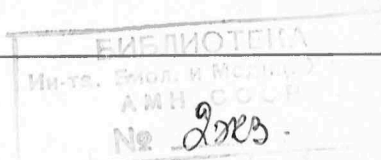
ТУРАКУЛОВ Я. Х. (Ташкент)

ТЯХЕПЫЛД Л. Я. (Тарту)

ШАПОВ В. С. (Москва)

ЯКОВЛЕВ Н. Н. (Ленинград)

ЯСАЙТИС А. А. (Вильнюс)



thymidine was unaltered in intact rats. Content of RNA was not distinctly altered in spleen of B<sub>1</sub>-deficient rats within the 4 days of immuno-

genesis. Acute deficiency of vitamin B<sub>1</sub> thus impaired synthesis of DNA in spleen during development of immunogenesis.

УДК 612.115.1.015

Е. А. Чирятьев, О. П. Леонова, А. Ш. Бышевский

## АМИНОКИСЛОТНЫЙ СОСТАВ И СВОЙСТВА ИНГИБИТОРОВ САМОСБОРКИ ФИБРИНА

Кафедра биохимии Тюменского медицинского института

Самосборка фибрина — единственный неферментативный процесс, завершающий сложный механизм формирования сети нестабилизированного фибрина [1]. До сих пор нет сложившихся представлений о механизмах регуляции этого процесса и эффекторах, модифицирующих самосборку фибрина в норме.

Установлено, что плазма (сыворотка) крови обладает антиполимеризационной активностью, не обусловленной ранее известными ингибиторами самосборки — продуктами распада фибриногена или комплексами гепарина с биологически активными соединениями [2]. Получены данные, указывающие на присутствие в плазме крови и тканях внутренних органов ингибитора самосборки фибрина пептидной природы, содержание которого в тканях коррелирует с состоянием гемокоагуляции, но достаточно постоянно в плазме крови [6]. Уровень ингибитора изменяется с возрастом и зависит от положения животного на эволюционной «лестнице» [4], что наряду с вышеуказанным свидетельствует о роли ингибитора в регуляции свертывания крови на уровне заключительного, филогенетически наиболее древнего этапа.

Установлено, что антиполимеризационная активность реализуется по конкурентному типу торможения путем образования малоактивных комплексов ингибитора с промежуточными продуктами процесса самосборки. В состав сформировавшегося фибринового сгустка ингибитор не включается [3].

В настоящей работе приведены данные об аминокислотном составе ингибиторов самосборки пептидной природы, полученных из плазмы крови человека, характере взаимодействия пептидов с мономерным фибрином, а также антиполимеризационной активности

плазмы, обусловленной присутствием в ней пептидов-ингибиторов.

### Методика

Ингибиторы самосборки фибрина выделяли из плазмы крови человека с помощью ультрафильтрации (целлофан Т-100), ионообменной хроматографии на ДЭАЭ-сефадексе А-25 и гель-фильтрации на сефадексе G-15, как описано ранее [5]. Чистоту препаратов контролировали хроматографией на бумаге и пластинках «Фиксцион 50×8» [8]. Гомогенность ингибиторов оценивали по числу пиков оптической плотности (280 нм) после обработки препаратов ингибиторов финилизотиоцианатом с последующей хроматографией на колонке Ultrasphere ODS (4,6×250 мм) в градиенте 0,005 М ацетат аммония — этанол от 0 до 40 % за 20 мин на жидкостном хроматографе высокого давления (Altex-324). Во всех случаях наблюдался 1 пик роста оптической плотности. Гидролиз индивидуальных пептидов проводили с помощью 6 н. соляной кислоты в среде аргона в присутствии 0,050 % β-меркаптоэтанол и 0,10 % фенола в течение 24 ч при 110 °С. Аминокислотный анализ пептидов осуществляли на автоматическом аминокислотном анализаторе LKB-4101 в трехбуферной натриевой системе с применением ионообменной смолы Duglum DC 6A.

Мономерный фибрин выделяли из нефракционированной бычьей плазмы [10]. Эффективность торможения самосборки фибрина исследуемыми ингибиторами рассчитывали по формуле  $i = 1 - V_0/V_k$ , где  $i$  — эффективность торможения,  $V_k$  и  $V_0$  — скорость самосборки в контроле и опыте соответственно. Количество ингибитора выражали в условных единицах активности (ЕА) с помощью графика зависимости количества ингибитора от эффективности торможения [2]. Фрагмент D выделяли из 120-часового триптического гидролизата фибриногена [7].

Ингибитор метили с помощью  $[^{131}\text{I}]$  [11], освобождаясь от несвязавшегося йода гель-фильтрацией на колонке с сефадексом G-15. Радиометрию проводили с помощью установок ДП-100 и пересчетного устройства ПП-16.

Эффективность торможения самосборки пептидным ингибитором и фрагментом D порознь, а также при их совместном введении оценивали, исходя из того, что суммация эффектов наблюдается при  $i_{1,2} = (i_1 + i_2) - i_1 \cdot i_2$ , синергизм — при  $i_{1,2} > (i_1 + i_2) - i_1 \cdot i_2$ , антагонизм — при  $i_{1,2} < (i_1 + i_2) - i_1 \cdot i_2$ , где  $i_{1,2}$  — эффективность торможения при совместном введении

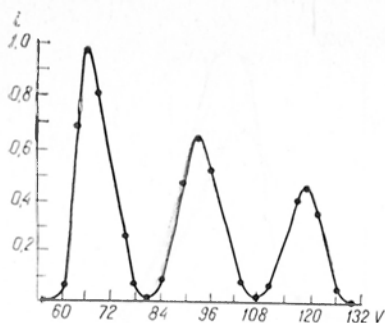


Рис. 1. Хроматографический профиль антиполимеризационной активности при гель-фильтрации ингибиторов самосборки фибрина, выделенных из плазмы крови человека.

По оси абсцисс — объем элюента (в мл), по оси ординат — эффективность торможения.

двух ингибиторов,  $i_1$  и  $i_2$  — эффективность торможения при введении ингибиторов в систему самосборки порознь.

### Результаты и обсуждение

В результате операций, направленных на выделение носителя антиполимеризационной активности, после гель-фильтрации на сефадексе G-15 (колонка  $25 \times 1000$  мм, элюент — 0,075 М аммонийно-ацетатный буферный раствор, pH 7,6) во всех опытах ( $n=50$ ) обнаруживались 3 пика ингибиторной активности (рис. 1). Различное время удержания антиполимеризационной активности в хроматографической колонке косвенно свидетельствует о том, что каждому пику активности соответствует индивидуальный носитель. При рехроматографии в тех же условиях наиболее активных фракций каждого из пиков порознь объемы выхода антиполимеризационной активности индивидуальных носителей не отличались от представленных на рис. 1. Препараты ингибиторов при исследовании их хроматографией на бумаге FN-11 в системе бутанол — уксусная кислота — вода в соотношении 40:1:50 и 4:1:1 (каждый растворитель пропускали дважды) не отличались по величине  $R_f$  и не содержали примеси свободных аминокислот (рис. 2, см. вклейку).

Анализ хроматографического профиля ингибиторов при гель-фильтрации на сефадексе G-15 по результатам 10 параллельных определений показал, что площадь отдельных пиков, определенная планиметрическим способом, составляет  $37,7 \pm 4,0\%$ ,  $39,4 \pm 2,2\%$  и  $22,9 \pm 2,3\%$  общей площади всех пи-

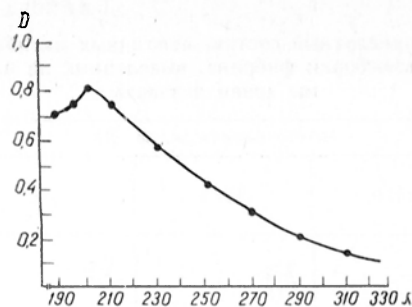


Рис. 3. Спектр светопоглощения смеси пептидов.

По оси абсцисс — длина волны (в нм); по оси ординат — оптическая плотность.

ков для первого, второго и третьего пиков соответственно. В плазме крови доноров ( $n=300$ ) содержится  $37,0 \pm 2,0$  ед. ингибиторной активности. Это означает, что на долю большего по молекулярной массе пептида приходится  $13,95 \pm 1,48$  ЕА; на долю среднего и меньшего пептидов соответственно  $14,58 \pm 0,9$  и  $8,74 \pm 0,85$  ЕА.

В спектре светопоглощения (190—340 нм) нет характерных максимумов в области 280 нм, следовательно, в молекуле пептидов отсутствуют ароматические аминокислоты. Рост светопоглощения с максимумом при 206 нм характерен для функциональных групп, образующих пептидную связь (рис. 3).

Отсутствие ароматических аминокислот избавило от необходимости использовать при изучении аминокислотного состава щелочной гидролиз. В кислых гидролизатах пептида с наибольшей молекулярной массой (1470 Да) автоматический аминокислотный анализ обнаружил 14 аминокислотных остатков (1-й пик ингибиторной активности). При анализе гидролизатов пептидов 2-й и 3-й пиков (молекулярная масса 1258 и 970 Да соответственно) выявлено 12 и 9 аминокислотных остатков соответственно (табл. 1).

Обращает на себя внимание, что во всех 3 пептидах глутаминовая кислота и глицин повторяются дважды. Кроме того, в среднем и меньшем по величине пептидах «вырезаны» одни и те же аминокислотные остатки — валин и изолейцин. Это наводит на мысль о происхождении пептидов-ингибиторов из общего белка-предшественника путем ограниченного протеолиза. Трудно допустить, чтобы различные предшест-

К ст. *Е. А. Чирягьева* и соавт.

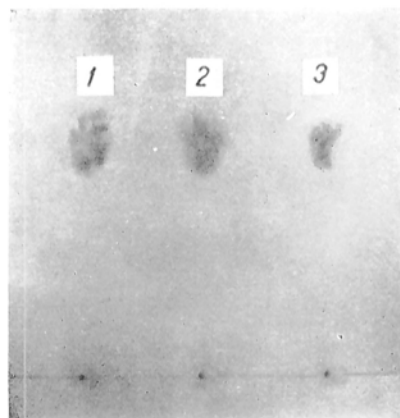


Рис. 2. Хроматограмма пептидных ингибиторов самосборки фибрина на бумаге FN-11.

1, 2, 3 — пептидные ингибиторы, соответствующие трем пикам антиполимеризационной активности (см. рис. 1).

К ст. *Н. В. Трубицыной* и соавт.

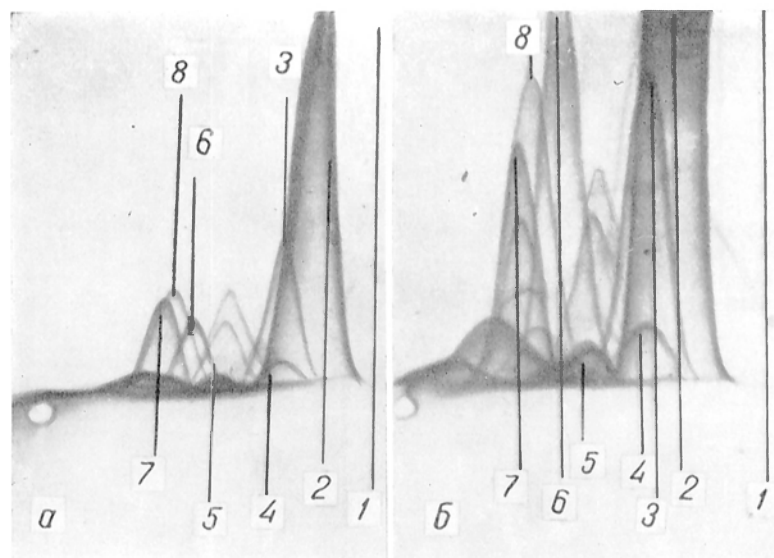


Рис. 1. Перекрестный иммуноэлектрофорез белков двух различных образцов (*А* и *Б*) сыворотки крови человека.

В лунку вносили 5 мкл в 20 раз разведенной сыворотки крови. Верхний гель содержал 5,5 мкл кроличьей полиспецифической антисыворотки на 1 см<sup>2</sup> геля, толщиной 0,15 см. 1 — преальбумин; 2 — альбумин; 3 —  $\alpha_1$ -антитриглицерин; 4 —  $\alpha_2$ -антихимоцитринин; 5 — церулоплазмин; 6 — гаптоглобин; 7 — трансферрин; 8 — гемоксигенин.

Таблица 1

Аминокислотный состав пептидных ингибиторов самосборки фибрина, выделенных из плазмы крови человека

Молекулярная масса, Да		
1470	1258	970
Asp Tre Ser Glu (2 остатка) Pro Gly (2 остатка) Ala Val Ile Leu Lys Arg	Asp Tre Ser Glu (2 остатка) Pro Gly (2 остатка) Ala  Leu Lys Arg	Asp  Glu (2 остатка) Pro Gly (2 остатка) Ala  Lys Arg

Примечание. Значения молекулярных масс установлены по результатам аминокислотного анализа.

венники при протеолизе образовывали почти одинаковые фрагменты с однотипной биологической активностью и дублированием одних и тех же аминокислот.

Характерной особенностью изучаемых пептидов является наличие большого числа аминокислот с ионогенным радикалом. Так, в меньшем по массе пептиде из 9 аминокислотных остатков 5 — Asp, Glu (2 остатка), Lys, Arg — могут находиться в ионном состоянии при физиологических условиях, т. е. способны к электростатическим взаимодействиям. Ранее нами высказано предположение [3], что во взаимодействии ингибитор — мономерный фибрин ведущая роль принадлежит электростатическому типу связей. Данные об аминокислотном составе пептидов-ингибиторов с очевидностью подтверждают это предположение.

Анализ зависимости скорости самосборки от значения pH реакционной среды (рис. 4), позволяет предположить, что пептидные ингибиторы являются донорами отрицательно заряженных функциональных групп для образования связи с мономерным фибрином; уменьшение экранирования отрицательных зарядов (повышение pH от 6,3 до 8,5) ведет к росту антиполимеризационной активности. Об этом же свидетельствует изменение эффекта на прямо противоположный при pH 6,3: пептид приобретает свойства активировать самосборку при сущест-

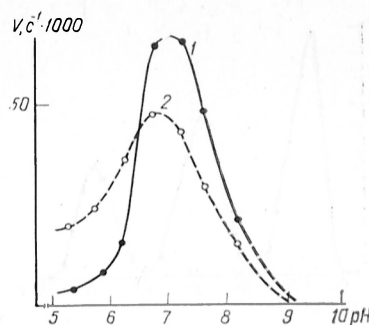


Рис. 4. Зависимость скорости самосборки от pH в отсутствие (1) и в присутствии (2) пептидного ингибитора (1258 Да) самосборки фибрина.

По оси абсцисс — значения pH; по оси ординат — скорость самосборки. Зависимости скорости самосборки от pH для остальных ингибиторов идентичны.

венной блокаде способности к ионизации отрицательно заряженных функциональных групп.

Так как pH изменяется как в контроле (без ингибитора), так и в пробах с ингибитором, полученный результат можно расценивать не как следствие влияния pH на механизм полимеризации, а как результат его влияния на взаимодействие мономерный фибрин — ингибитор. Почему при подавлении диссоциации по кислотному типу ( $pH < 6,3$ ) пептид начинает активировать самосборку, неясно. Интерес к уточнению этого обстоятельства несуществен для понимания биологических свойств пептида, так как столь низкое значение pH в организме нереально.

Известно, что повышение ионной силы, создаваемое нейтральной солью, как и изменение pH, замедляет самосборку, удлиняя путь этого процесса [1] за счет ослабления межмолекулярных электростатических взаимодействий [13]. В наших исследованиях повышение ионной силы, создаваемое хлоридом натрия, с 0,14 до 0,42 М сопровождалось ростом эффективности торможения (с 0,25 до 0,45) при постоянной концентрации ингибитора. На этом основании можно допустить, что пептидный ингибитор подобно повышению ионной силы или pH является фактором, ослабляющим электростатические взаимодействия между молекулами мономерного фибрина путем блокады участков связывания.

Известно, что в сегменте  $\alpha$ -цепи фибриногена, относящемся к фрагменту D, где находится один из complemen-

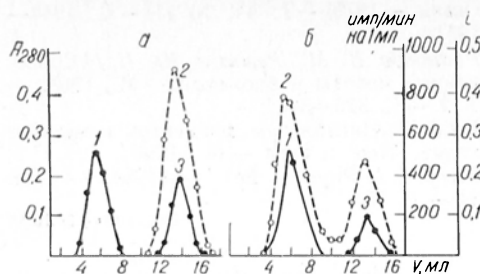


Рис. 5. Хроматографический профиль фрагмента D и пептидного ингибитора, меченного  $[^{131}\text{I}]$ , при гель-фильтрации порознь (а) и смеси фрагмент D — ингибитор (б).

По оси абсцисс — объем элюата; по осям ординат слева — оптическая плотность, справа — радиоактивность и эффективность торможения. 1 — оптическая плотность, 2 — радиоактивность, 3 — эффективность торможения.

тарных центров взаимодействия [9], присутствуют кластеры положительных зарядов, обеспечивающие электростатические взаимодействия с отрицательно заряженными центрами в Е домене мономерного фибрина. Для уточнения локализации участков связывания пептидного ингибитора с мономерным фибрином мы изучали возможность образования ассоциатов пептида с фрагментом D фибриногена. Для этого инкубировали (37°C, 30 мин) смесь фрагмента D (1,5 мг/мл) и пептидного ингибитора (35 ЕА/мл), меченного  $[^{131}\text{I}]$  (14 300 имп/мин на 1 мл), затем смесь подвергали гель-фильтрации на сефадексе G-15 (элюент — 0,14 М раствор хлорида натрия), определяя оптическую плотность элюатов при 280 нм (концентрация фрагмента D), их радиоактивность и способность тормозить самосборку фибрин-мономера (концентрация ингибитора). На рис. 5 видно, что радиоактивность распределилась между фракциями, соответствующими выходу ин-

гибитора и фрагмента D. В элюатах, соответствующих фрагменту D, содержится 48,2 % введенного ингибитора (по радиоактивности). Одновременно на 60,5 % снижается концентрация ингибитора в соответствующих ему фракциях. Это указание на взаимодействие пептидного ингибитора с фрагментом D мы проверили, изучая влияние ингибиторов совместно и порознь на самосборку фибрина (табл. 2). Независимо от исследовавшихся концентраций пептидного ингибитора и фрагмента D обнаружен их выраженный антагонизм: экспериментальная эффективность торможения ниже расчетной [12] в среднем на  $41,4 \pm 4,9$  %, что подтверждает образование комплекса ингибитор — фрагмент D. Эти экспериментальные данные сразу наводят на мысль, что, являясь конкурентами в реакции самосборки фибрина, пептидный ингибитор и фрагмент D взаимодействуют с одними и теми же участками в мономерном фибрине — центрами комплементарности домена Е. Однако зависимость от pH и ионной силы, а также возможность образования комплекса фрагмент D — пептид, указывают на то, что отрицательно заряженный ингибитор конкурирует с центрами комплементарности домена Е за положительно заряженные центры домена D в фибрине, взаимодействуя с последними.

Итак, стабильная антиполимеризационная активность плазмы крови обеспечивается 3 пептидами — ингибиторами самосборки фибрина. Близость аминокислотного состава ингибиторов может рассматриваться как признак их происхождения из общего предшественника путем ограниченного протеолиза. Торможение самосборки является следствием взаимодействия пеп-

Таблица 2

Эффективность торможения самосборки фибрина (i) фрагментом фибриногена и пептидным ингибитором совместно и порознь

Концентрация пептидного ингибитора, ЕА/мл	Концентрация фрагмента D, мг/мл			
	0,0	1,38	0,69	0,34
0,0	—	$0,46 \pm 0,02$	$0,43 \pm 0,01$	$0,32 \pm 0,01$
28,0	$0,52 \pm 0,01$	$0,59 \pm 0,01$ (0,74)	$0,45 \pm 0,01$ (0,70)	$0,46 \pm 0,01$ (0,65)
19,7	$0,44 \pm 0,02$	$0,57 \pm 0,01$ (0,73)	$0,43 \pm 0,01$ (0,68)	$0,41 \pm 0,02$ (0,63)
11,0	$0,32 \pm 0,03$	$0,53 \pm 0,01$ (0,67)	$0,43 \pm 0,04$ (0,62)	$0,34 \pm 0,01$ (0,56)

Примечание. В скобках — теоретически рассчитанная эффективность торможения.



тидов с мономерным фибрином в области доменов D, что сопровождается ослаблением электростатических взаимодействий между молекулами фибрина.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Белицер В. А., Варецкая Т. В. // Укр. биохим. журн. — 1975. — № 5. — С. 567—579.
2. Бышевский А. Ш., Чирятов Е. А. // Там же. — 1983. — № 3. — С. 260—265.
3. Бышевский А. Ш., Чирятов Е. А. // Вопр. мед. химии. — 1983. — № 5. — С. 22—27.
4. Бышевский А. Ш., Чирятов Е. А., Умутбаева М. К. // Гематол. и трансфузиол. — 1985. — № 1. — С. 35—38.
5. Бышевский А. Ш., Чирятов Е. А., Умутбаева М. К. // Вопр. мед. химии. — 1985. — № 5. — С. 30—32.
6. Бышевский А. Ш., Чирятов Е. А., Умутбаева М. К., Тажудинова С. И. // Гематол. и трансфузиол. — 1986. — № 6. — С. 26—31.
7. Варецкая Т. В. Строение и свойства фибриногена и фибрина: Самосборка волокон фибрина: Дис. ... д-ра биол. наук. — Киев, 1977.
8. Дэвени Т., Гергей Я. Аминокислоты, пептиды и белки: Пер. с англ. — М., 1976.
9. Луговской Э. В. // Укр. биохим. журн. — 1982. — № 5. — С. 578—594.
10. Мухачева И. А., Бышевский А. Ш. // Биохимия. — 1979. — Т. 44, № 11. — С. 1944—1951.

11. Родионов В. М., Решетко Ю. П. // Современные методы в биохимии. — М., 1968. — Т. 2. — С. 326—346.
12. Узбб Л. Ингибиторы ферментов и метаболизма: Пер. с англ. — М., 1966.
13. Ferry J. // Physiol. Rev. — 1954. — Vol. 34. — P. 753.

Поступила 24.05.88

## THE ANTIPOLYMERIZATION ACTIVITY OF HUMAN BLOOD PLASMA, AMINO ACID COMPOSITION AND PROPERTIES OF INHIBITORS OF FIBRIN SELF-ASSEMBLY

E. A. Chiryal'ev, O. P. Leonova, A. Sh. Bychevsky

Chair of Biochemistry, Medical School, Tyumen

Three peptides, inhibitors of fibrin self-assembly, were shown to be responsible for stable antipolymerization activity of blood plasma. Similarity of amino acid composition of these inhibitors might be considered as an indication of their origin from a common precursor by means of limited proteolysis. Inhibition of the self-assembly occurred due to interaction of the peptides with monomeric fibrin in the region of domains D, which was accompanied by loosening of electrostatic interactions between molecules of fibrin.

УДК 616.711-018.1-002-092-07

О. Т. Титаренко, С. А. Тиходеев, Т. Л. Перова, Е. А. Липская

## БИОХИМИЧЕСКИЕ КРИТЕРИИ ВОСПАЛИТЕЛЬНОГО ПРОЦЕССА ПРИ ОСТЕОМИЕЛИТЕ ПОЗВОНОЧНИКА

НИИ фтизиопульмонологии Минздрава РСФСР, Ленинград

Адекватная интерпретация результатов биохимических исследований у больных с заболеваниями опорно-двигательного аппарата нередко затруднена в связи с отсутствием параллелизма между стадией и распространенностью процесса, особенностями его течения и общей реакцией организма. Оценка последней, как правило, основывается на изменении содержания в крови белков острой фазы заболевания, которые, отражая активность воспалительного процесса, не позволяют судить о характере местных изменений [12]. Для этих целей в последние годы предлагается исследовать содержание в крови продуктов метаболизма коллагена, который является основным белком соединительной ткани и содержание которого в кости достигает 95 % [11]. Такого рода исследования проводили у больных с опухолью позвоночника, с ревмато-

идным артритом, с травмами костей и суставов, с деформирующим артрозом [2—5, 9]. Вышесказанное определяет целесообразность изучения содержания в биологических жидкостях оксипролина, являющегося «меткой» коллагена [13, 15, 17], у больных остеомиелитом позвоночника, оценка стадии и направленности течения которого обычно сложна, и вопрос о диагностической ценности перечисленных показателей в сопоставлении с белками острой фазы у данной категории больных не нашел должного освещения в литературе.

### Методика

Обследовано 36 больных с гематогенным остеомиелитом позвоночника в возрасте  $44,5 \pm 3,0$  года. В 34 случаях (94,4 %) продолжительность заболевания колебалась в пределах 1 мес — 2 лет (в среднем  $8,6 \pm 1,2$  мес) и у 2 больных составила 6 и 10 лет. У всех больных процесс ограничивался 2 позвонками, степень деструкции которых оценивали