

Архив журнала

Вопросы медицинской химии

ISSN 0042-8809

1986

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 meditsinskoi khimii

ISSN 0042-8809

1986

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 XXXII

ВЫПУСК 2

МАРТ—АПРЕЛЬ

Двухмесячный научно-теоретический журнал

Основан в 1955 г.

ВОПРОСЫ МЕДИЦИНСКОЙ ХИМИИ



МОСКВА · МЕДИЦИНА · 1986

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. ЛОК-
ШИНА, В. Н. ОРЕХОВИЧ, Л. Ф. ПАНЧЕНКО, М. Ш. ПРОМЫСЛОВ, Е. Л. РО-
ЗЕНФЕЛЬД, Ю. А. РОМАКОВ (ответственный секретарь), В. А. САКС, С. Е. СЕ-
ВЕРИН, В. Б. СПИРИЧЕВ

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)
ТЯХЕПЫЛЬД Л. Я. (Тарту)
УТЕВСКИЙ А. М. (Харьков)
ШАПОТ В. С. (Москва)
ЯКОВЛЕВ Н. Н. (Ленинград)
ЯСАЙТИС А. А. (Вильнюс)



Адрес редакции журнала:

Москва, Солянка, 14

АМН СССР

Тел. 297-16-44

Зав. редакцией Л. А. Фирсова

(spleen, myocardium, skeletal muscle) or mediated through adrenal glands (liver tissue). The tissue-dependent activation of the oxidative enzymes, which accompanied the steroidogenic

effect of the immunoglobulins studied, was considered as a result of interaction between the antibodies and tissue-specific antigen determinants in adrenal gland chromatin.

УДК 615.276.4:577.112.853

Г. И. Чипенс, П. П. Зариньш, Л. П. Осис, Ю. Е. Анцанс

ПЕРВИЧНАЯ СТРУКТУРА И ВИДОВАЯ СПЕЦИФИЧНОСТЬ ИММУНОПОЭТИНОВ

Институт органического синтеза АН Латвийской ССР, Рига

Большинство реакций гуморального и клеточного иммунитета определяется и реализуется взаимодействием трех основных типов иммунологически активных клеток — В-, Т-лимфоцитов и макрофагов. В настоящее время известно несколько десятков субпопуляций этих клеток [3], что свидетельствует о высокой дифференциации их функций. Большое общее число лимфоцитов (в организме человека около 10^{12}) и потенциальных клонов (10^8), участие в процессах кооперации при высокой дифференциации функций требуют для управления и координации их действия наличия эффективной регуляторной системы. Исследования последних лет свидетельствуют, что наряду с гормонами тимуса, интерлейкинами, монокинами и другими клеточными факторами функции иммунорегуляции осуществляют также молекулы иммуноглобулинов (Ig) [21], которые являются предшественниками регуляторных пептидов, образующихся в реакциях ограниченного протеолиза [2]. В 1970 г. был выделен первый низкомолекулярный пептид этого ряда — тафтсин — тетрапептид Thr—Lys—Pro—Arg иммуноглобулина G (IgG Eu 289—292), имеющий весьма широкий спектр биологического действия (стимуляция фагоцитоза, биосинтеза антител и др. [9]). В Институте органического синтеза АН Латвийской ССР был обнаружен новый иммунорегулятор — ригин (Gly—Gln—Pro—Arg, IgG Eu 341—344), также имеющий широкий спектр биологического действия, который, однако, отличается от такового тафтсина [1, 10].

Изыскание новых фрагментов IgG как потенциальных иммунорегуляторов можно проводить различными методами. Один из эмпирических подходов к этому — так называемый метод «делинзации», или «фрагментации»,

первичной структуры Ig, т. е. последовательный синтез и проверка биологической активности фрагментов Ig, включающих 8—10 аминокислотных остатков [21]. Другой путь — это априорное выявление активных участков или фрагментов на основе известных закономерностей структурной и функциональной организации пептидно-белковых веществ и механизмов их действия [5, 6]. Применяя представления о квазициклических структурах активных центров пептидов и белков [4, 6], механизмов реакций ограниченного протеолиза и квазициклизации [7] и некоторые принципы теории информации, мы обнаружили новую группу иммунологически активных пептидов — потенциальных природных биорегуляторов [11].

Применение принципа квазициклизации к изучению фермент-субстратного взаимодействия позволяет предложить для реакций ограниченного протеолиза следующую модель (рис. 1). Ферментативное расщепление пептидной связи (фермент F_2) приводит к образованию свободных amino- и карбоксильных групп (фрагменты 2 и 3), которые при взаимодействии с функциональными группами боковых остатков аминокислот пептидной цепи по-

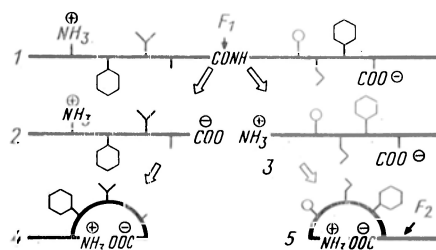


Рис. 1. Схема реакций ограниченного протеолиза и квазициклизации.

Пептидная цепь условно показана в виде черной ленты с некоторыми боковыми остатками аминокислот (см. текст).

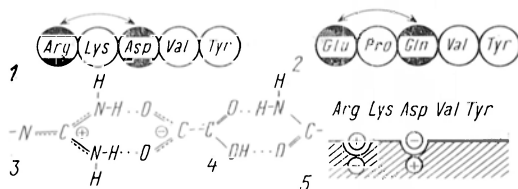


Рис. 2. Модели структур тимопептина, TP-5 (1) и иммунопептина G, IPG-5 (2).

Стрелками показано предполагаемое взаимодействие боковых остатков при квазициклизации молекулы. Показаны также структуры, замыкающие квазицикл (3, 4). 5 — модель «квадруполя» (см. текст).

средством ионных, водородных и других нековалентных связей могут служить центрами внутримолекулярной квазициклизации молекул (см. примеры образования квазициклических форм пептидных гормонов и кининов [12, 13, 20]). В результате квазициклизации образуются новые пространственные структуры — возможные активные центры молекул (фрагменты 4 и 5), которые могут обеспечить взаимодействие Ig с клеточными рецепторами (появление новой биологической функции, например, при действии структуры 4) или с новыми ферментными системами (последующее отщепление фрагмента под действием фермента F_2 с образованием потенциального биорегулятора и новых центров квазициклизации), что вызывает новую цепь реакций квазициклизации. Следовательно, согласно модели, предполагается, что в первичной структуре молекул Ig закодирована определенная последовательность отщепления фрагментов Ig, выполняющих функции иммунорегуляторов и включающих поэтапно необходимые биохимические реакции, определяющие, например, от-

дельные стадии кооперации В-, Т-лимфоцитов и макрофагов и ряд других функций. Точки начала реакций ограниченного протеолиза и квазициклизации в случае молекул Ig могут находиться на поверхностях доменов (как в случае образования тафетина [19]), в участках междоменной пептидной цепи (пример биогенеза ригина [14]) или в С-концевых участках цепи, где одним из центров квазициклизации может служить карбоксильная или амидная группа С-концевой аминокислоты [8].

Для проверки высказанных предположений о реакциях ограниченного протеолиза и квазициклизации, их значении в образовании новых иммунорегуляторов интерес представляет анализ аминокислотных последовательностей Ig вблизи уже известных фрагментов Ig, обладающих иммунорегулирующими функциями, например тафетина и ригина. Если предположения о реакциях ограниченного протеолиза и квазициклизации соответствуют истине, то в одну или другую сторону от аминокислотной последовательности тафетина или ригина в Ig должны быть локализованы активные центры молекул или фрагменты, которые после отщепления выполняют функции иммунорегуляторов. Наше внимание привлекла аминокислотная последовательность пентапептида Gly—Pro—Gln—Val—Tyr (IgG Eu 345—349), расположенная в правую сторону от ригина.

Как известно [16, 18], один из конформеров тимопептина (TP-5) имеет квазициклическое строение (образование ионной связи между остатками

Таблица 1

Структурное сходство IP различных групп Ig человека и активного центра тимопептина I и III (спленина) быка (данные секвенций и нумерации по [17])

IPG-5 (345—349 по системе Eu)
IPM-5 (451—455 по системе Ou)
IPE-6 (450—455 по системе Ou)

IPA-5 (345—349 по системе Eu)
TP_I-5 (32—36, тимопептин I)

TP_{III}-5 (32—36, тимопептин III)

Гомологичные IP районы у мышей b:

IgG
IgM
IgE
IgA

	Glu —	Pro —	Gln —	Val —	Tyr
	Arg —	Pro —	Asp —	Val —	Tyr
Ala —	Ala —	Pro —	Glu —	Val —	Tyr
	Arg —	Pro —	Glu —	Val —	His
	Arg —	Lys —	Asp —	Val —	Tyr
	Arg —	Lys —	Glu —	Val —	Tyr
	Ala —	Pro —	Gln —	Val —	Tyr
	Pro —	Pro —	Ala —	Val —	Tyr
Ser —	Ala —	Pro —	Glu —	Val —	Tyr
	Pro —	Pro —	Gln —	Val —	His

Первичная структура гомологичных IPG-5 районов различных биологических видов (район IgG 345—349 по системе индексации Ен [17])

Биологический вид и подгруппа IgG	Аминокислотная последовательность гомологичных фрагментов IgG															ЧАИС IgG		
Человек (IgG 1—4)	Pro	—	Arg	—	Glu	—	Pro	—	Gln	—	Val	—	Tyr	—	Thr	—	Leu	13
Кролик	Pro	—	Leu	—	Glu	—	Pro	—	Lys	—	Val	—	Tyr	—	Thr	—	Met	3
Заяц	Ala	—	Leu	—	Glu	—	Pro	—	Lys	—	Val	—	Tyr	—	Thr	—	Met	1
Одичавший американский кролик	Ala	—	Leu	—	Glu	—	Pro	—	Lys	—	Val	—	Tyr	—	Thr	—	Leu	1
Пищуха	Ala	—	Leu	—	Glu	—	Pro	—	Lys	—	Val	—	Tyr	—	Val	—	Leu	1
Мышь (IgG1)	Pro	—	Srg	—	Ala	—	Pro	—	Gln	—	Val	—	Tyr	—	Thr	—	Ile	2
Мышь (IgG2a)	Val	—	Arg	—	Ala	—	Pro	—	Gln	—	Val	—	Tyr	—	Val	—	Leu	4
Мышь (IgG2b—A)	Val	—	Arg	—	Ala	—	Pro	—	Gln	—	Val	—	Tyr	—	Thr	—	Leu	2
Мышь (IgG2b—B)	Val	—	Arg	—	Ala	—	Pro	—	Gln	—	Val	—	Tyr	—	Ile	—	Leu	1
Морская свинка (IgG1)	Pro	—	Arg	—	Ile	—	Pro	—	Glx	—	Val	—	Tyr	—	Leu	—	Leu	1
Морская свинка (IgG2)	Pro	—	Arg	—	Met	—	Pro	—	Asp	—	Val	—	Tyr	—	Thr	—	Leu	1

Примечание. Здесь и в табл. 3—5 ЧАИС — число анализированных индивидуальных структур.

аргинина и аспарагиновой кислоты). Учитывая принципы сигнатур и эквивокации теории информации (сигнатуры — это наборы свойств молекул, определяющие функцию; сигнатуры, согласно принципу эквивокации, в некоторых ситуациях могут быть общими у различных аминокислотных остатков [6, 12]), можно предположить, что остатки глутаминовой кислоты и глутаминна могут выполнять аналогичные функции, фиксируя квазициклическую структуру посредством водородной связи (рис. 2). Этому может способствовать изгиб молекулы остатком пролина [4, 6]. С-концевые дипептиды у обоих пептидов имеют одинаковое строение.

Структурное сходство IgG 345—349 и тимопентина позволяет высказать предположение, что в N-концевом участке домена C_H3 IgG после ригина может быть расположен функционально активный центр молекулы. Эта идея получила новый стимул, когда при анализе первичных структур Ig классов M, A и E в гомологичных фрагменту IgG 345—349 участках (иммуноглобулины имеют до 40 % гомологии первичных структур, что отражает их эволюцию из общего предшественника) были выявлены аналогичные структуры. Новым соединением было дано условное обозначение — им-

мунопоэтины (IP). Третья буква в сокращенном обозначении иммунопоэтинов, например IPG-5, обозначает группу Ig, а цифра — число аминокислотных остатков в молекуле (табл. 1).

Результаты сопоставления гомологичных IgG 345—349 районов аминокислотных последовательностей Ig классов G, M, A и E отражены в табл. 1—5. В табл. 1 показано структурное сходство фрагментов молекул Ig человека и активного центра тимопентина I и III быка. Здесь же приводятся и гомологичные секвенции мыши — единственного биологического вида, кроме человека, у которого выявлена первичная структура этого района во всех группах Ig. В табл. 2—5 сопоставлены аминокислотные последовательности всех биологических видов, для которых структура данного района молекулы Ig установлена в пределах одного класса. Кроме секвенции IP, показаны также соседние (по две вправо и влево от IP) аминокислоты.

Как видно из табл. 1, наиболее близкое структурное сходство с TP₁-5 имеет IPM-5, который отличается лишь аминокислотой второго положения (Pro в IPM-5, Lys в TP₁-5). Однако именно пролин, имеющий фиксированный угол φ в пятичленной системе пирролидона, обеспечивает изгиб пеп-

Таблица 3

Первичная структура гомологичных IPM-5 районов различных биологических видов (район IgM 451—455 по системе индексации Он [17])

Биологический вид	Аминокислотная последовательность гомологичных фрагментов IgM	ЧАИС IgM
Человек	Leu — His — Arg — Pro — Asp — Val — Tyr — Leu — Leu	3
Мышь	Lys — His — Pro — Pro — Ala — Val — Tyr — Leu — Leu	4
Собака	Val — His — Met — Pro — Ser — Val — Tyr — Val — Leu	1
Цыпленок [15]	Ala — Arg — Pro — Pro — Ser — Val — Tyr — Val — Phe	1

Таблица 4

Первичная структура гомологичных IPA-5 районов различных биологических видов (район IgA 345—349 по системе индексации Ен [17])

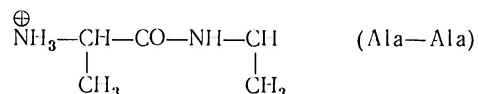
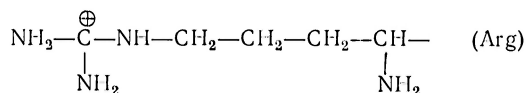
Биологический вид и подгруппа IgA	Аминокислотная последовательность гомологичных фрагментов IgA	ЧАИС IgA
Человек (IgA1)	Thr — Phe — Arg — Pro — Gln — Val — His — Leu — Leu	1
Человек (IgA1)	Thr — Phe — Arg — Pro — Glu — Val — His — Leu — Leu	1
Человек (IgA2)	Thr — Phe — Arg — Pro — Glu — Val — His — Leu — Leu	2
Мышь	Thr — Phe — Pro — Pro — Gln — Val — His — Leu — Leu	3

Таблица 5

Первичная структура гомологичных IPE-6 районов различных биологических видов (район IgE 450—455 по системе индексации Он [17])

Биологический вид	Аминокислотная последовательность гомологичных фрагментов IgE	ЧАИС IgE
Человек	Pro — Arg — Ala — Ala — Pro — Glu — Val — Tyr — Ala — Phe	3
Мышь	Gln — Arg — Ser — Ala — Pro — Glu — Val — Tyr — Val — Phe	2
Крыса	Lys — Arg — Ser — Ala — Pro — Glu — Val — Tyr — Val — Phe	1

тидной цепи и придает молекулам IP уникальную специфическую пространственную структуру, отличающуюся от таковой в TP-5. Следовательно, можно ожидать, что спектр действия различных IP может отличаться от биологической активности TP-5. Своеобразную структуру имеет IPE-6 (гексапептид группы IgE), который вместо остатка аргинина имеет два остатка аланина. Предполагается, что α -аминогруппа-N-концевого Ala может выполнять те же функции, что и основная гуанидиновая группа Arg боковой цепи:



Наиболее широкие вариации в IP имеет структура аминокислоты в положении 3 (Glu, Asp, Gln), что, по-видимому, в значительной мере определяет спектр действия соединений (известно [16], что естественная мутация в TP_{III}-5 Asp→Glu значительно изменяет биоэффекты этого соединения). В IPA-5 остаток Tyr в положении 5 заменен на His. Для сравнения приведены гомологичные фрагменты молекул Ig мышей. В основном просматриваются те же закономерности: остаток Pro² и C-концевой дипептид Val—Tyr в (IPA-5 дипептид Val—His) оста-

ются неизменными, но в отличие от фрагментов Ig человека в положении 1 доминируют аминокислоты Pro и Ala. Если сравнивать гомологичные фрагменты Ig человека и мыши, то в классах G и E они отличаются только одной заменой (Glu¹—Ala¹ и Ala¹—Ser¹ соответственно). Структурное сходство указанных районов молекул Ig мыши и TP-5 выражено слабее.

Как видно из табл. 2—5, на сегодняшний день подробнее других изучена первичная структура IgG. Интересно сравнивать вариабельность двух аминокислот вправо и влево от секвенции IP. Так, в разных подклассах IgG мыши (IgG1, IgG2a, IgG2b) центральный пентапептид остается константным, что свидетельствует о его функциональном значении; именно соседние аминокислоты в каждом подклассе варьируют. Эта же закономерность наблюдается в родственных биологических видах (например, у кролика, зайца, одичавшего американского кролика и пищухи): при константном центральном пентапептиде варьируют соседние аминокислоты. Видовая специфичность более отдаленных биологических видов проявляется, очевидно, заменами аминокислот в положениях 1 и 3 (или в одном из них). Примерно такие же закономерности наблюдаются и в остальных классах Ig.

Проведенный анализ аминокислотных последовательностей гомологичных IP районов у различных биологических видов в классах G, M, A и E молекул Ig показывает, что данная секвенция является относительно консервативной. Изменения в положениях 1 и (или) 2 можно отнести к видовой специфичности. Две аминокислоты вправо и влево от фрагмента IP подвергнуты большим мутационным изменениям и, по-видимому, имеют меньшее функциональное значение.

Таким образом, результаты проведенного анализа свидетельствуют в пользу нашего предположения о существовании в доменах C_H3/C_H4 нового функционально активного центра (фрагмента). Для подтверждения этого предположения мы синтезировали секвенции IP: Glu—Pro—Gln—Val—Tyr (IPG-5), Arg—Pro—Asp—Val—Tyr (IPM-5), Arg—Pro—Glu—Val—His (IPA-5), Ala—Ala—Pro—Glu—Val—Tyr (IPLE-6). Первичные данные исследования биологических свойств

синтезированных соединений в опытах *in vitro* в тесте спонтанного E-розеткообразования Т-лимфоцитов человека (опыты были проведены в лаборатории молекулярной биологии и фармакологии пептидов Института органического синтеза АН Латвийской ССР под руководством канд. биол. наук Г. А. Афанасьевой) показали, что иммунопоэтины G и M, подобно TP-5 и левамизолу, в сопоставимых диапазонах концентраций оказывают нормализующее действие на Т-лимфоциты, имеющие повышенную или пониженную активность, но не влияют на активность нормальных Т-лимфоцитов [11]. Таким образом, нами выявлена новая группа потенциальных природных иммунорегуляторов — иммунопоэтинов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Залитис Г. Н., Афанасьева Г. А., Голубева В. В. и др. — В кн.: Перспективы биорганической химии в создании новых лекарственных препаратов. Рига, 1982, с. 86.
2. Локина Л. А. — Успехи биол. химии, 1977, т. 28, с. 162—164.
3. Манько В. М. — Журн. Весоюз. хим. о-ва им. Д. И. Менделеева, 1982, т. 27, № 4, с. 389—397.
4. Никифорович Г. В., Галактионов С. Г., Чипенс Г. И. — Изв. АН ЛатвССР, 1979, № 2, с. 94—107.
5. Чипенс Г. И. — Вести. АН СССР, 1979, № 1, с. 67—76.
6. Чипенс Г. И. — В кн.: Структура и функции низкомолекулярных пептидов. Рига, 1980, с. 11—124.
7. Чипенс Г. И. — Вопр. мед. химии, 1984, № 3, с. 37—43.
8. Чипенс Г. И., Анцанс Ю. Е., Бисенице Д. А. и др. — Изв. АН ЛатвССР, серия хим., 1984, № 3, с. 362—365.
9. Чипенс Г. И., Веретенникова Н. И. — В кн.: Структура и функции низкомолекулярных пептидов. Рига, 1980, с. 206—211.
10. Чипенс Г. И., Веретенникова Н. И., Никифорович Г. В. — Изв. АН ЛатвССР, 1983, № 8, с. 65—74.
11. Chipens G., Ancans J., Biseniece D. et al. — In: European Peptide Symposium. 18-th, Abstracts. Upsala, 1984, p. 173.
12. Chipens G. I., Krikis A. Y., Polevaya I. K. — In: Biophysical and Biochemical Information Transfer in Recognition / Ed. J. G. Vasileva-Popova, E. V. Jensen. New York, 1979, p. 23—48.
13. Chipens G., Mutulis F., Galaktionov S. — In: Frontiers of Bioorganic Chemistry and Molecular Biology / Ed. S. Ananchenko. Oxford, 1980, p. 99—103.
14. Chipens G. I., Veretennikova N. I., Nikiforovich G. V., Atare Z. A. — In: Peptides, 1980 / Ed. K. Brunfeldt. Copenhagen, 1981, p. 445—450.

15. *Dahan A., Reynaud C. A., Weill J. C.* — Nucl. Acids Res., 1983, vol. 11, p. 5381—5389.
16. *Goldstein G., Andhya T., Heavner G. A.* — In: Peptides. Synthesis, Structure, Function / Ed. D. H. Rich, E. Gross. Rockford, 1981, p. 535—539.
17. *Kabal E. A., Wu T. T., Bilofsky H. et al.* — In: Sequences of Proteins of Immunological Interest. Bethesda, 1983, p. 188—196.
18. *Krishna N. R., Heavner G. A., Vangh J. B.* — J. Amer. Chem. Soc., 1983, vol. 105, p. 6930—6934.
19. *Najjar V. A., Nishioka K.* — Nature, 1970, vol. 228, p. 672—673.
20. *Ovchinnikov Y., Chipens G., Ivanov V.* — In: Peptides, 1982 / Ed. K. Blaha, P. Malon. Berlin, 1983, p. 1—17.
21. *Stanworth D. R.* — Molec. Immunol, 1982, v. 19, p. 1245—1254.

Поступила 28.11.84

THE PRIMARY STRUCTURE AND SPECIFICITY OF IMMUNOPOIETINS

G. I. Chipens, P. P. Zarin'sh, L. P. Osis, Yu. E. Anlsans

Institute of Organic Synthesis, Academy of Sciences of the Latvian SSR, Riga

A model involving quasicyclization of protein molecules following the stepwise reactions of limited proteolysis was developed. On the basis of the model new active sites were detected in immunoglobulins of various species as well as chemical synthesis of the sites was carried out. The new group of the substances was designated as immunopoietins. The primary structure of various species immunoglobulins was analyzed and evolutionary stability of the immunopoietin structure was shown.

УДК 616.379-008.64-092.9-07:[616.15-008.6:616.151.55]

Б. А. Кудряшов, Л. А. Ляпина

КОМПЛЕКСООБРАЗОВАНИЕ ГЕПАРИНА С ДИАБЕТОГЕННЫМ ФАКТОРОМ ПЛАЗМЫ КРОВИ

Лаборатория физиологии и биохимии свертывания крови МГУ им. М. В. Ломоносова

Ранее было показано присутствие в плазме крови крыс, больных аллоксановым диабетом [1], и в плазме крови людей, больных сахарным диабетом [6], диабетогенного фактора (ДГФ), вызывающего у здоровых животных устойчивую гипергликемию после внутривенного его введения. Предварительная инфузия гепарина реципиентам за 5 мин до инъекции плазмы крови больных диабетом животных или людей полностью исключала развитие гипергликемии [1, 6].

Настоящее исследование было проведено с целью изучения характера взаимодействия ДГФ с гепарином.

Методика

Гомогенный ДГФ был выделен из плазмы крови больных диабетом крыс и людей. Он представляет собой белок альбумин с мол. массой 60 000 дальтон. Комплексообразование ДГФ с гепарином контролировали методом пересекающего электрофореза [9]. Электрофорез проводили в 0,05 М фосфатном буфере pH 7,4 при напряжении 15 В/см в течение 2,5 ч. Электрофореграммы окрашивали 0,033 % раствором азур II (на кислые группы гепарина) и 0,1 % раствором амидо черного 10В (на белок).

Для образования комплекса гепарина с ДГФ использовали 0,1 % растворы в 0,85 % растворе NaCl каждого из реагентов. Их смешивали в соотношениях гепарин — ДГФ, равном 6:1, 3:1, 1:1, 1:3, 1:6, 1:12 (по весу) и выдерживали в течение 15—30 мин при

37 °С. Максимальное образование комплекса гепарина и ДГФ происходило при их весовом соотношении 1:1 в реакционной среде. Наилучшее осаждение комплекса наблюдали при изоэлектрической точке pH 5,0. Осаждение производили при 4—6 °С в течение не менее 40—60 мин, после чего центрифугировали в течение 10—15 мин при 1800 об/мин. Полученные осадки (комплексы) промывали дважды охлажденной до 0 °С дистиллированной водой, центрифугируя каждый раз, и высушивали в струе воздуха.

Антикоагулянтные свойства комплекса изучали, используя метод, описанный Сирман [7]; неферментативную фибринолитическую активность комплекса определяли, как описано ранее [3, 5].

Результаты и обсуждение

Методом пересекающегося электрофореза было показано комплексообразование между гепарином и белковым ДГФ (см. рисунок на вклейке). В месте контакта гепарина с ДГФ белок не окрашивался амидо черным 10В, а гепарин — азуром II. Это свидетельствовало о достаточно прочном взаимодействии между гепарином и ДГФ, а также о том, что в комплексообразовании принимают участие кислые, по-видимому, сульфогруппы гепарина.

Поскольку известно, что многие ранее изученные комплексные соединения гепарина обладают антикоагулянтной активностью [8] и являются физиологическими растворителями неста-