

ство оставшихся центров к субстратам существенно не изменяется.

Для выявления вклада окислительных реакций была изучена термическая инаktivация тканевого тромбопластина при 60 и 100° после 5-минутного пропускания азота через суспензию тромбопластина (рис. 3).

Как видно из рис. 3, в атмосфере азота термическая инаktivация тканевого тромбопластина происходит медленнее, чем на воздухе. Но и после устранения атмосферного кислорода порядок реакции процесса инаktivации продолжает оставаться сложным.

Исследования показывают, что инаktivация тромбопластина на воздухе является сложным процессом, в котором, наряду с денатурацией белкового компонента и окислительными реакциями, имеет значение дезорганизация липопротеидных ансамблей, из которых состоит этот инициальный фактор свертывающей системы крови. Хранение препаратов тканевого тромбопластина в анаэробных условиях увеличивает их биологическую стабильность.

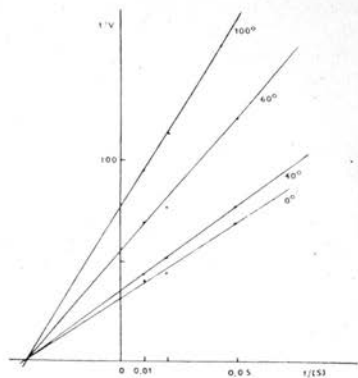


Рис. 2. График Лайнуивера-Бэрка.

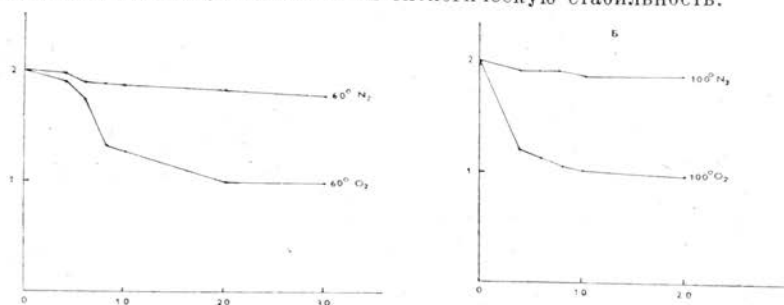


Рис. 3. Динамика тепловой инаktivации тканевого тромбопластина в атмосферном воздухе и азоте.

По оси ординат — активность тромбопластина в lg-шкале; по оси абсцисс — время в мин. А — температура инаktivации 60°, Б — температура инаktivации 100°.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Жоли М. Физическая химия денатурации белков. М., Мир, 1968.
2. Зубаиров Д. М. Биохимия свертывания крови. М., Медицина, 1978.
3. Паттон А. Энергетика и кинетика биохимических процессов. М., Мир, 1968.
4. Koller F., Leliger A., Duckert F. Acta haemat., 1951, 6, 1.
5. Thies H. A. Menschliche und tierische Gewebstrombokinasen. Georg Thieme Verlag. Stuttgart, 1957.

Поступила 18 ноября 1982 г.

УДК 577.157.2

### ВЛИЯНИЕ МОДИФИКАЦИИ БЕЛКОВОЙ ЧАСТИ ТРОМБОПЛАСТИНА (ФАКТОРА III) НА ЕГО ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ С ФАКТОРАМИ VII И V

Р. Ф. Байкеев, Г. Ш. Ченборисова

Кафедра биохимии (зав. — проф. Д. М. Зубаиров) Казанского ордена Трудового Красного Знамени государственного медицинского института им. С. В. Курашова

**Реферат.** Было изучено влияние ферментативной модификации белковой части тромбопластина на его взаимодействие с факторами VII и V. Показано, что действие папаина на апотрогенин нарушает взаимодействие указанных факторов с тромбопластином, в результате образуется активатор фактора X с меньшей активностью, чем до модификации.

Ключевые слова: тканевой тромбопластин, фактор VII, фактор V.  
3 таблицы. Библиография: 23 названия.

Тканевой тромбопластин (фактор III) — белково-липидный комплекс, который состоит из апопротеина и смеси фосфолипидов [7, 8]. Подобный комплекс служит наиболее сильным пусковым механизмом свертывающей системы плазмы крови и в условиях поврежденного кровяного русла представлен осколками разрушенных клеток эндотелия и других тканей [3]. Апопротеин III является интегральным гликопротеидом клеточных мембран, молекулярная масса его составляет около 52000 дальтон, содержание углеводов — 6—7% [8].

Тромбопластин образует стабильный комплекс с фактором VII в присутствии  $\text{Ca}^{2+}$ , при этом образуется активный фактор VIIa [16].

Физиологическая роль комплекса тромбопластин—фактор VII заключается в активировании фактора X путем протеолитического отщепления пептида в его тяжелой цепи [9]. Фактор Xa в присутствии ионов кальция, фосфолипидов и плазменного фактора V действует на свой субстрат — протромбин, из которого образуется тромбин. До настоящего времени не изучено влияние фактора V на этап взаимодействия фактора VII с тромбопластином.

Кроме того, комплекс тромбопластин—фактор VIIa инициирует реакции внутренней системы свертывания посредством активирования фактора IX [13, 17]. Этот факт может служить объяснением сравнительно слабой кровоточивости у людей с врожденными нарушениями начальной части внутреннего пути свертывания — дефицитом факторов XII, XI, прекалликреина, высокомолекулярного кининогена (ВМК).

Основное значение для проявления тромбопластического действия осколками клеточных мембран имеет распределение в них фосфатидилэтаноламина и фосфатидилсерина [3, 4, 14, 23]. Однако в последнее время появились сообщения, указывающие на то, что для коагуляционной активности важную роль играет состояние белков, встроенных в клеточные мембраны [15, 18, 20]. В исследованиях Д. М. Зубairoва и соавт. (1981) была изучена роль белковой части тканевого тромбопластина путем ее специфической ферментативной модификации. Воздействие на тромбопластин папаина приводило к уменьшению биологической активности тромбопластина. Предполагается, что белковый компонент тромбопластина важен для специфического распределения липидных составных частей, обеспечивающих взаимодействие с кальцийсвязывающими участками факторов II, VII, X.

Задачей настоящей работы является изучение взаимодействия тромбопластина с факторами VII и V в условиях специфической ферментативной модификации папаином его белковой части.

Фактор VII получали по методу Вильямса и др. (1965). Препарат фактора VII использовали в конечной концентрации с  $E_{280}^{1\text{cm}} = 0,125$  в 0,01 М трис-HCl, pH — 7,4. Для определения активности фактора VII применяли субстрат — оксалатную плазму, полностью дефицитную по факторам VII, XII, XI, калликреину [1]. Субстратная плазма содержала фибриноген, протромбин, факторы X, IX, VIII, V. При рекальцификации и добавлении тканевого тромбопластина субстратная плазма ввиду отсутствия факторов VII и XII не свертывалась более 24 ч. Коагулирование субстратной плазмы восстанавливалось лишь при добавлении фактора VII или фактора XIa.

Фактор V получали по методу Папахадипоулоса и др. (1964). Активность фактора V определяли по методу Вольфа (1953). Применяли препарат фактора V с активностью 100% в 0,05 М трис-HCl pH = 7,35.

Нами использован препарат тканевого тромбопластина (Каунасское предприятие). Содержание кальция в нем составляло 2,6 мкмоль на 1 мг. Белковую часть тромбопластина протеолитически модифицировали папаином [5]. В дальнейшем тромбопластин с модифицированной белковой частью обозначали как фактор IIIм, а немодифицированный тромбопластин — фактор IIIн. Величины парциального торможения активности тромбопластина вычисляли по формуле:  $i = 1 - \frac{T_n}{T_m}$  [2], где  $T_n$  — время свертывания плазмы крови в присутствии фактора IIIн,  $T_m$  — время свертывания плазмы крови в присутствии фактора IIIм.

Результаты анализировали статистически по Р. А. Фишеру (1958).

Было проделано 8 серий опытов по изучению взаимодействия факторов VII, V,  $\text{Ca}^{2+}$  с тромбопластином путем различных сочетаний изучаемых компонентов. В первой серии опытов 4 мг фактора IIIм или равное количество фактора IIIн суспендировали в 1 мл раствора фактора VII, содержащего 0,005 М  $\text{CaCl}_2$ . Обе пробы инкубировали в течение 3 мин при 37° С и охлаждали, помещая в тающий лед. Тромбо-

пластин осаждали центрифугированием при 95000 d в течение 30 мин при 4° С. Супернатант удаляли. Эта комбинация обозначается как фактор III — (VII + Ca<sup>2+</sup>).

Во второй серии были выполнены процедуры первой серии, но без добавления в систему кальция: фактор III—VII. Остаточное содержание кальция в препарате тромбопластина приблизительно в 500 раз меньше, чем в опытах с добавлением Ca<sup>2+</sup>.

Осажденные центрифугированием препараты тромбопластина, полученные в этих сериях опытов, троекратно отмывали путем ресуспендирования и осаждения в 0,05 М трис-HCl, pH — 7,2. Отмытые препараты гомогенизировали пластиковым пестиком в 1 мл того же буфера. Об активности фактора VIIa, образовавшегося комплекса с тромбопластином, судили по времени свертывания плазмы с полным дефицитом фактора VII [1]. Остаточную активность фактора VII в супернатантах, полученных в первой и второй сериях, определяли по времени свертывания той же плазмы в системе: 0,1 мл супернатанта + 0,1 мл фактора IIIн (4мг/мл) + 0,1 плазмы с дефицитом фактора VII + 0,2 мл хлористого кальция (0,025 М). Каждую серию опытов повторяли трижды. Результаты представлены в табл. 1.

Таблица 1

Взаимодействие тромбопластина с фактором VII и Ca<sup>2+</sup>

Серии №	Комплекс	Время свертывания, с			
		осадок		супернатант	
		фактор IIIн	фактор IIIм	фактор IIIн	фактор IIIм
1	Фактор III—(VII+Ca <sup>2+</sup> )	2538±63	3574±58	7269±196	5251±104
2	Фактор III—VII	3433±83	5041±99	6136±218	4807±203

Как видно из табл. 1, фактор VII, вступивший в комплекс с тканевым тромбопластином, восстанавливает способность к свертыванию субстратной плазмы с полным дефицитом факторов VII, XI, XII, фактора Флетчера и ВМК. Полученные данные подтверждают известные сведения [16, 21], что ионы кальция необходимы для взаимодействия фактора VII с тромбопластином (табл. 1, серии 1, 2). В присутствии Ca<sup>2+</sup> большая часть фактора VII связывается с тромбопластином, а меньшая остается в супернатанте. Доля остающегося в супернатанте фактора VII после осаждения тромбопластина увеличивается в отсутствие Ca<sup>2+</sup> ( $P < 0,01$ ). Модификация белковой части тромбопластина приводит к увеличению остаточной активности фактора VII в супернатанте, не вступившего в комплекс с тканевым тромбопластином как в присутствии ионов Ca<sup>2+</sup> ( $P < 0,001$ ), так и без них ( $P < 0,002$ ).

В третьей серии опытов последовательно инкубировали факторы IIIм и IIIн сначала с фактором VII, а потом с фактором V в присутствии Ca<sup>2+</sup>: фактор III — (VII + Ca<sup>2+</sup>) — (V + Ca<sup>2+</sup>); в четвертой серии — сначала с фактором V, а потом с фактором VII: фактор III — (V + Ca<sup>2+</sup>) — (VII + Ca<sup>2+</sup>); в пятой серии — одновременно с факторами V, VII и Ca<sup>2+</sup>: фактор III — (VII + V + Ca<sup>2+</sup>); в шестой серии факторы IIIм и IIIн инкубировали только с фактором VII и Ca<sup>2+</sup>: фактор III — (VII + Ca<sup>2+</sup>). Активность фактора VII определяли, как в первой серии опытов. Результаты приведены в табл. 2.

Таблица 2

Взаимодействие тромбопластина, факторов VII и V

Серии №	Комплекс	Время свертывания, с		i
		фактор IIIн	фактор IIIм	
3	Фактор III—(VII+Ca <sup>2+</sup> )—(V+Ca <sup>2+</sup> )	2450±45(1)	3805±85(1)	0,356±0,25
4	Фактор III—(V+Ca <sup>2+</sup> )—(VII+Ca <sup>2+</sup> )	26,8±0,1(2)	43,4±1,2(2)	0,382±0,012
5	Фактор III—(VII+V+Ca <sup>2+</sup> )	2529±73(1)	3809±51(1)	0,337±0,009
6	Фактор III—(VII+V+Ca <sup>2+</sup> )	27,0±0,4(2)	43,3±1,4(2)	0,376±0,018
5	Фактор III—(VII+V+Ca <sup>2+</sup> )	2519±58(1)	3794±79(1)	0,336±0,012
6	Фактор III—(VII+Ca <sup>2+</sup> )	26,6±0,9(2)	43,0±0,4(2)	0,381±0,006
6	Фактор III—(VII+Ca <sup>2+</sup> )	2494±52(1)	3757±52(1)	0,336±0,012
6	Фактор III—(VII+Ca <sup>2+</sup> )	26,9±0,9(2)	43,1±0,5(2)	0,375±0,013

Примечание. 1 — время свертывания субстратной плазмы, дефицитной по факторам VII, XI, XII, фактору Флетчера и ВМК;  
2 — время свертывания нормальной лиофилизированной плазмы.

Из данных табл. 2 (3—5-е серии) видно, что связывание фактора VII с фактором III не зависит от того, был ли фактор V добавлен в систему до, одновременно или после инкубации фактора VII с тромбопластином. Более того, исключение фактора V (6-я серия) не влияет на связывание фактора VII с тканевым тромбопластином. Модификация белковой части тромбопластина уменьшает активность образующегося комплекса фактор III — фактор VII. При использовании тестирующей системы с нормальным содержанием плазменных факторов свертывания крови ингибирование в пятой серии опытов было выражено в большей мере ( $P < 0,001$ ).

В седьмой серии опытов факторы IIIм и IIIн инкубировали только с фактором V в присутствии  $\text{Ca}^{2+}$ : фактор III — ( $\text{V} + \text{Ca}^{2+}$ ), а в восьмой серии при этом не использовали  $\text{Ca}^{2+}$ : фактор III + V. В контрольных опытах (9-я серия) фактор V заменяли буферным раствором. О биологической активности препаратов судили по времени свертывания человеческой плазмы, дефицитной по фактору V [22]. Результаты приведены в табл. 3.

Таблица 3

Взаимодействие тромбопластина с фактором V

Серии №	Комплексе	Время свертывания, с		i
		фактор IIIн	фактор III м	
7	Фактор III—( $\text{V} + \text{Ca}^{2+}$ )	$23,2 \pm 0,9$	$55,6 \pm 1,4$	$0,582 \pm 0,013$
8	Фактор III—V . . . . .	$24,7 \pm 0,1$	$57,7 \pm 1,0$	$0,573 \pm 0,012$
9	Фактор III . . . . .	$104,7 \pm 1,6$	$157,0 \pm 1,6$	$0,333 \pm 0,054$

Как видно, фактор V способен почти одинаковым образом взаимодействовать с тромбопластином как в присутствии, так и в отсутствии  $\text{Ca}^{2+}$  (см. табл. 3, 7 и 8-я серии). Это объясняется, видимо, тем, что в составе самого фактора V имеется 1 грамм-атом на 300 000 дальтон прочно связанного кальция (11). Воздействие папаина на тромбопластин нарушает этот процесс, что выявляется при сравнении времени свертывания плазмы в присутствии фактора IIIм и фактора IIIн.

Как видно из сравнения результатов, приведенных в таблицах 2 и 3 (6 и 7-я серии), модификация белковой части тканевого тромбопластина в большей мере нарушает образование активного комплекса с фактором V, чем с фактором VII. Индексы ингибирования в седьмой ( $i = 0,528 \pm 0,013$ ) серии опытов больше ( $P < 0,001$ ), чем в шестой ( $i = 0,336 \pm 0,012$ ).

На основании полученных данных можно заключить, что, помимо участия в активации фактора VII, апопротейн III важен еще для взаимодействия тканевого тромбопластина с фактором V. Об этом свидетельствует увеличение индекса ингибирования в тестирующей системе, специфически чувствительной к фактору V. Взаимодействие фактора V с тромбопластином (7 и 8-я серии) лишь незначительно зависит от ионов кальция. Отражением взаимодействия фактора V с апопротейном III, видимо, являются несколько большие индексы ингибирования в 3—6-й сериях опытов при выявлении активности тромбопластина не на дефицитной по фактору VII, а на нормальной плазме, где вклад фактора V в скорость образования фибрина, несомненно, больше ввиду меньшей специфичности данной тестирующей системы.

Фактор Va повышает сродство фактора Xa к отрицательно заряженным фосфолипидам [12]. В исследованиях методом  $^{31}\text{P}$ -ЯМР показано, что добавление к смеси фосфатидилэтаноламина и фосфатидилхолина апопротейна тромбопластина приводит к иммобилизации на белке полярных головных групп этих липидов [10]. Ранее было показано [5], что при действии папаина на тромбопластин химическому изменению подвергается лишь его белковая часть, от которой отщепляется только  $4,7 \pm 2,7\%$  пептидного материала, а липидная часть остается химически неизменной.

В наших исследованиях показано, что в специфичных системах по изучению факторов VII и V с тромбопластином в условиях модификации белковой части тромбопластина папаином образуется активатор фактора X с меньшей активностью, чем до модификации. Наблюдаемое явление в свете известных данных [5, 10] можно объяснить тем, что в результате действия папаина на белковую часть тромбопластина

изменяется белково-липидное взаимодействие в тромбопластине и, как результат, нарушается взаимодействие тромбопластина с факторами VII и V.

Возможно, модификация белковой части тканевого тромбопластина отражается не только на взаимодействии с факторами VII, V, но и с протромбином и фактором X. Это вполне вероятно, так как, согласно матричной гипотезе свертывания крови [4], факторы VII, V, X и протромбин в присутствии  $Ca^{2+}$  образуют функциональный ансамбль на поверхности осколков клеточных мембран.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Байкеев Р. Ф. В кн.: Тезисы докладов V Всесоюзного симпозиума «Синтетические полимеры медицинского назначения». Рига, 1981.—2. Диксон М., Уэбб Э. Ферменты. М., изд-во «Иностранная литература», М., 1961.—3. Зубаиров Д. М., Грицук Г. Н., Владимиров Л. Ф. и др. В кн.: Система свертывания крови и фибринолиз. Киев, Здоров'я, 1969.—4. Зубаиров Д. М. Казанский мед. ж., 1977, 6.—5. Зубаиров Д. М., Соболева И. В., Вожинская З. В. и др. Биохимия, 1981, 7.—6. Фишер Р. А. Статистические методы для исследователей, М., 1958.—7. Bjorklid E., Storm E., Prydz H. Biochem Biophys Res. Commun., 1973, 55, 3.—8. Bjorklid E., Storm E., Biochem. J., 1977, 165, 1.—9. Fujikawa K., Titani K., Davie E. W. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1975, 72, 9.—10. Gaudinier I. E., Howell R. M. Biochem. Soc. Trans., 1981, 9, 1.—11. Greenquist A. C., Colman R. W., Blood, 1975, 46, 5.—12. Lindhout M., Gower-Riemslog J., Rosing J., Hemker H., Thromb. and Haemost., 1981, 46, 1.—13. Lindquist P. A., Fujikawa K., Davie E. W. J. Biol. Chem., 1978, 253, 6.—14. Liy D. T. H., McCoy L. E., Thromb. Res., 1975, 7, 1.—15. Lyberg T., Prydz H., Biochemistry, 1981, 194, 3.—16. Nemerson Y., Esnouf M. P. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1937, 70, 2.—17. Osterud B., Rapaport S. I. Jbid. 1977, 74, 12.—18. Osterud B., Bögwald J., Lindahl U., Seljelie R., FEBS Lett., 1981, 127, 1.—19. Parahadjopoulos D., Hongie C., Nanahan D. J. Biochemistry, 1964, 3, 2.—20. Prydz H., Allison A. C. Thromb. and Haemost., 1978, 39, 3.—21. Williams W. J., Norris D. G., J. Biol. Chem., 1965, 241, 8.—22. Wolf P. A. J. Clin. Path., 1953, 6, 1.—23. Zwaal R. F. A., Biochim. et biophys. acta, 1978, 515, 1.

Поступила 1 декабря 1982 г.

УДК 611—018:[577.153.35+577.157.2]—07:577.15.082

## РАСПРЕДЕЛЕНИЕ 5'-НУКЛЕОТИДАЗНОЙ И ТРОМБОПЛАСТИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ В ТКАНЯХ ЧЕЛОВЕКА

В. И. Кузнецов

*Кафедра биохимии (зав.—проф. Д. М. Зубаиров) Казанского ордена Трудового Красного Знамени медицинского института им. С. В. Курашова*

**Реферат.** Изучено распределение активности 5'-нуклеотидазы и тромбопластической активности в тканях человека. Наибольшая активность 5'-нуклеотидазы и тканевого тромбопластина установлена в микросомальной фракции. При гомогенизации активность 5'-нуклеотидазы и тканевого тромбопластина не разделялась. Мембранные структуры эндотелия аорты обладают наибольшей 5'-нуклеотидазной и тромбопластической активностью по сравнению с мембранной фракцией среднего слоя аорты.

**Ключевые слова:** энзимодиагностика, 5'-нуклеотидаза, тканевой тромбопластин.

1 таблица. Библиография: 12 названий.

Одним из основных применений диагностической энзимологии в настоящее время является измерение концентраций ферментов в сыворотке крови с целью обнаружения острого или хронического повреждения клеток. Определение активности сывороточной 5'-нуклеотидазы широко используется для диагностики гепатобилиарных заболеваний [9, 10]. Экспериментально и в клинических наблюдениях обнаружено значительное повышение активности 5'-нуклеотидазы в плазме крови при остром инфаркте миокарда. При изучении динамики активности 5'-нуклеотидазы в плазме крови было предположено, что фермент является индикатором поступления в кро-