

К. Л. ЕРЗИНКЯН

СПЕКТРОФОТОМЕТРИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ РЕАКЦИИ ОБРАЗОВАНИЯ КОМПЛЕКСА ФИБРИНОГЕН-ГЕПАРИН В ВИДИМОЙ ОБЛАСТИ

Методом видимой спектрофотометрии изучено комплексообразование тромбогенного белка фибриногена с антикоагулянтом гепарином. Установлено, что данная реакция в сильной степени зависит от рН среды, при которой она протекает.

Образование комплекса фибриноген-гепарин (КФГ) в организме является важным фактором антисвертывающей системы крови, обеспечивающим регуляцию ее жидкого состояния [2]. Наличие молекулы гепарина в КФГ препятствует вовлечению фибриногена в активный центр тромбина и его ферментативному расщеплению. Изучение природы сил, стабилизирующих устойчивую форму комплекса, и условий среды, при которых происходит его образование, является необходимым условием для понимания специфической биологической активности КФГ.

Материал и методика. Препараты фибриногена получали по методу Леви [5]. Концентрация фибриногена определялась по методу Бидвелла [4]. В опытах использовался гепарин фирмы «Спофа» (Чехословакия). Сухие препараты фибриногена и гепарина были растворены в физиологическом растворе, после чего растворы дотитровывались до необходимых значений рН.

Спектральные измерения проводились на регистрирующем спектрофотометре СП-8000 английской фирмы «Пай Уникам» на термостатированных при 25° 1 см кварцевых кюветах. Кривые светорассеяния снимались при фиксированной длине волны 350 нм путем смешивания растворов фибриногена и гепарина эквимольной концентрации в соотношении 1:1.

При выявлении комплексообразования фибриногена и гепарина по исчезновению метахроматического сдвига механизма поглощения толуидинового синего (ТС) использовались растворы последнего (0,003%), а также фибриногена (0,4%) и гепарина (0,02%) (рН 7,2). Ионная сила растворов 0,01 достигалась при помощи разбавления исходного раствора (ионная сила 0,15) дистиллированной водой.

Результаты и обсуждение. На рис. 1 представлены кривые взаимодействия фибриногена и гепарина, полученные при различных значениях рН среды. Как видно из рис. 1, продолжительность процесса составляет около 10 мин. Переход из области слабокислых значений рН в более кислую область увеличивает эффект осаждения фибриногена с гепарином. Наиболее интенсивное комплексообразование происходит при значениях рН 3,5—4,0. Возможность денатурации фибриногена в облас-

ти более кислых значений рН предопределила для изучения границу рН среды, равную 3,5.

Гепарин образует соединения с толуидиновым синим (ТС) [8]. Образование такого комплекса в водном растворе приводит к сдвигу максимума поглощения красителя в коротковолновую область и изменению

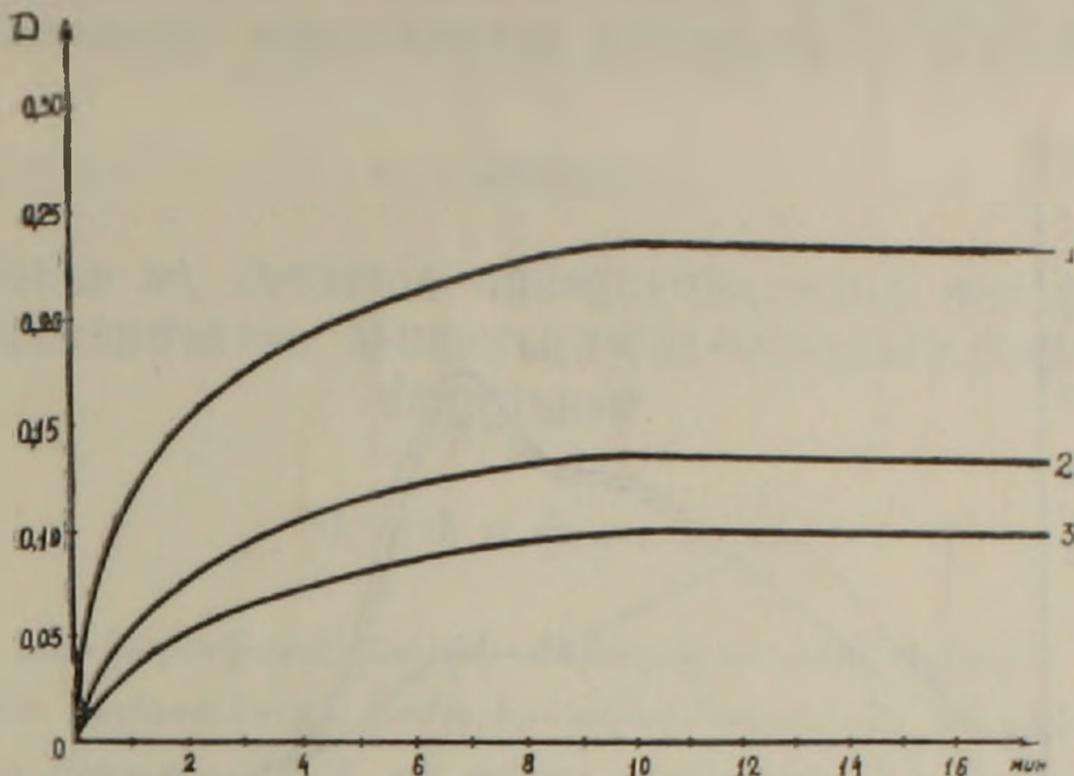


Рис. 1. Кривые взаимодействия фибриногена и гепарина, полученные при различных значениях рН—3,5 (1); 5,8 (2); 6,2 (3).

его окраски. Это происходит вследствие относительно точной ориентации катионов красителя при взаимодействии с анионными группами гепарина.

Для выявления способности фибриногена образовывать комплекс с гепарином нами добавлялись различные концентрации фибриногена к смеси ТС-гепарин при физиологических значениях рН (7,2).

Максимум поглощения ТС наблюдается в области 670 нм, а смеси ТС-гепарин—в области 620 нм. Гепарин сдвигает максимум поглощения ТС на 50 нм и уменьшает его интенсивность. Включение в данную систему фибриногена приводит к восстановлению максимума поглощения ТС как по длине волны, так и по интенсивности и исчезновению метахромазии, причем наиболее полное восстановление происходит при эквимолярном соотношении фибриногена и гепарина в растворе (рис. 2).

В качестве контроля изучалось взаимодействие фибриногена и ТС. Оно не сопровождается изменением в спектре ТС, что вместе с приведенным выше условием доказывает образование и существование устойчивой формы КФГ при изучаемых условиях.

Фибриноген оказывает конкурентное действие на ТС в связывании гепарина. Молекулы фибриногена вытесняют ТС из комплекса ТС-гепарин, возвращая его в свободное состояние, и сами вступают в комплекс с молекулами гепарина, что позволяет сделать вывод о большей устойчивости комплекса фибриноген-гепарин по сравнению с комплексом ТС-гепарин.

Имеющиеся в литературе данные свидетельствуют о том, что гепарин образует солеобразные комплексы с белками при участии положительно заряженных аминогрупп белка и отрицательно заряженных сульфогрупп гепарина [1, 6]. Наблюдаемое нами усиление эффекта комплексообразования фибриногена и гепарина с уменьшением рН среды также свидетельствует о наличии электростатических сил в КФГ. В области кислых значений рН 3,5 количество положительно заряженных групп

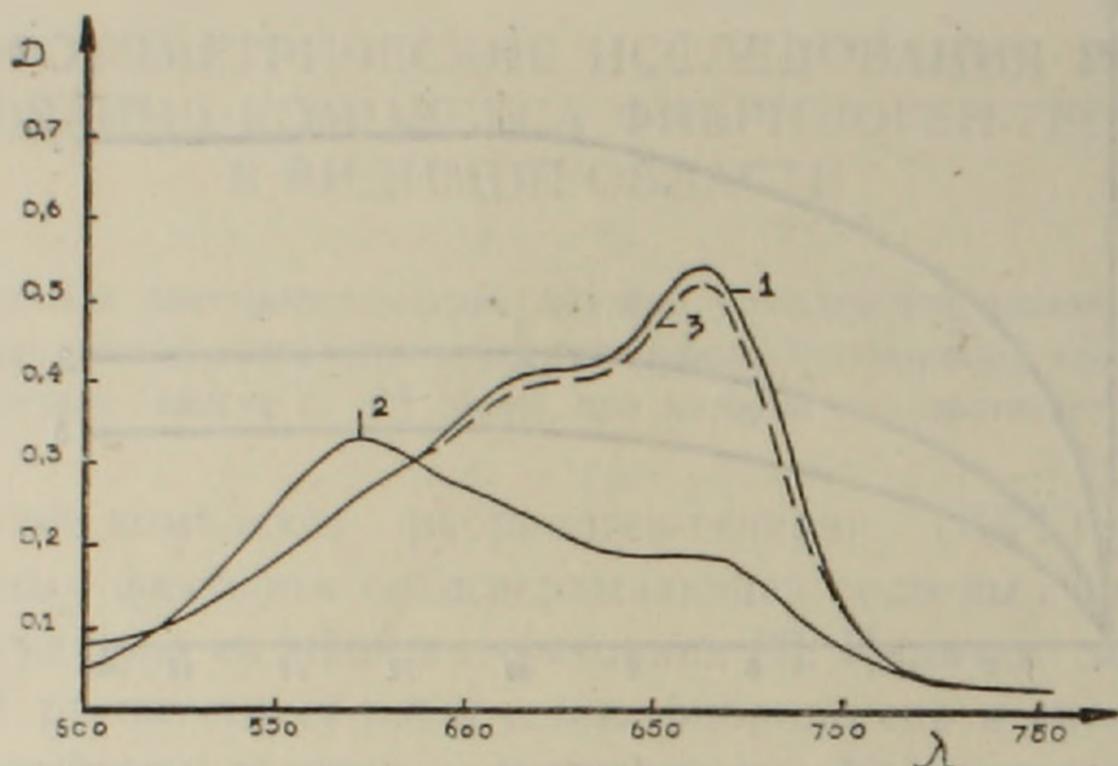


Рис. 2. Спектры поглощения ТС (1), смеси ТС+гепарин (2) и смеси ТС+гепарин+фибриноген (3).

фибриногена превалирует над отрицательно заряженными (изоэлектрическая точка фибриногена равна 5,5), и имеет место сильное электростатическое притяжение между положительными амино- и иминогруппами белка и отрицательно заряженными сульфогруппами гепарина, вызывающее значительную дегидратацию комплекса. Это взаимодействие ослабляется по мере перехода в область щелочных значений рН из-за уменьшения количества положительно заряженных групп фибриногена. При физиологических значениях рН (7,2) отрицательно заряженные группы фибриногена превалируют над положительно заряженными, и в этих условиях, следовательно, можно говорить лишь о локальных электростатических взаимодействиях в КФГ. Это позволяет предположить существование в комплексе водородных связей между подходящими донорными группами фибриногена и акцепторными группами гепарина, стабилизирующих его устойчивую форму. В качестве акцепторов протона могут служить сульфогруппы гепарина, а доноров—амино-, имино-, гидроксильные группы боковых цепей соответственно аминокислотных остатков аргинина, глутидина и тирозина. На это указывают полученные Ногучи [7] данные, который исследовал взаимодействие белков крови (фибриногена, сывороточного альбумина) с декстрансульфатом, содержащим $-\text{SO}_3^-$ группы. По мнению автора, существование этих комплексов в щелочной среде объясняется наличием в ней как электростатических, так и водородных связей, образуемых между аминогруппами белков и сульфогруппами полиэлектролита.

Выявленный по исчезновению метахроматического сдвига бимолекулярный характер КФГ при физиологических значениях рН (7,2) совпадает с полученными нами ранее методами микрокалориметрии и УФ-спектрофотометрии данными [3].

Институт химической физики
АН СССР

Поступило 30.VII 1974 г.

Կ. Լ. ԵՐԶԻՆԿՅԱՆ

ՖԻԲՐԻՆՈԳԵՆԻ ԵՎ ՀԵՊԱՐԻՆԻ ԿՈՄՊԼԵՔՍԱՎՈՐՄԱՆ ՌԵԱԿՑԻԱՅԻ ՍՊԵԿՏՐԱՖՈՏՈՄԵՏՐԻԿ ՈՒՍՈՒՄՆԱՍԻՐՈՒԹՅՈՒՆՆԵՐԸ ՏԵՍԱՆԵԼԻ ՍԱՀՄԱՆՈՒՄ

Ա մ փ ո փ ո լ մ

Տեսանելի սպեկտրաֆոտոմետրիկ մեթոդով ուսումնասիրվել է ֆիբրինոգենի տրոմբոզեն սպիտակուցի կոմպլեքսակազմավորումը անտիկոագուլյանտ հեպարինի հետ: Ապացուցվել է, որ տվյալ ռեակցիան մեծ չափով կախված է միջավայրի pH, որի մեջ նա ընթանում է:

Ֆիբրինոգեն-հեպարին կոմպլեքսի գոյությունը թույլ ալկալային միջավայրում հնարավորություն է տալիս ենթադրելու, որ նրա կայուն ձևի կազմավորմանը բացի ֆիբրինոգենի դրական լիցքավորված ամինա-իմինախումբերի և հեպարինի բացասական լիցքավորված սուլֆախմբերի էլեկտրաստատիկ ձգողության ուժերից, նույնպես մասնակցում են ջրածնային կապերը:

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Бычков С. М. *Вопр. мед. химии*, 12, 397, 1966.
2. Кудряшов Б. А., Калишевская Т. М., Ляпина Л. А. *Вопр. мед. химии*, 14, 277, 1973.
3. Розенфельд М. А., Ерзинкян К. Л., Пирузян Л. А. 6-ая Всесоюзная конференция по калориметрии, 469, Тбилиси, 1973.
4. Bidwell E. *Biochem. J.*, 53, 497, 1953.
5. Loewy B., Dunathan K., Gallant J. J. *Biol. Chem.*, 236, 2644, 1961.
6. Mathews M. B. *Biochem. J.*, 96, 710, 1965.
7. Noguchi N. *Suppl. of the Progr. of Theoret. Physics*, № 17, 41, 1961.
8. Yaques L. B., Bell N. Y. *Methods of Biochemical Analysis*, N. Y., 7, 253, 1959.