

УДК 612.115.35

БИОХИМИЯ

Д. М. ЗУБАИРОВ, Л. Г. ПОПОВА

МОЛЕКУЛЯРНЫЙ ВЕС НАТИВНОГО ФАКТОРА XII (ФАКТОРА ХАГЕМАНА) ЧЕЛОВЕКА

(Представлено академиком Б. А. Арбузовым 5 VII 1974)

Фактор Хагемана — белок, инициирующий свертывание крови. Присутствует в плазме крови в количестве, меньшем 1 мг на 100 мл. Белок из человеческой и бычьей плазмы был подвергнут 3000—5000-кратной очистке (^{1,2}). Однако оба препарата еще не были полностью гомогенными. Данные о молекулярном весе этого белка весьма противоречивы. Очищенные препараты фактора Хагемана из бычьей плазмы при получении разными методами обладали молекулярными весами $80\,000 \pm 20\,000$ (³); $79\,150$ (⁴); $82\,000$ (²); $141\,800 \pm 1480$ (⁵). Активизированный фактор Хагемана из человеческой плазмы при изучении методом седиментационного равновесия мигрировал как белок с молекулярным весом $20\,000$, а при гель-фильтрации как протеин с молекулярным весом более $100\,000$ (⁶). В ходе очистки возможны денатурационные изменения молекулы фактора Хагемана, весьма склонной к конформационным модификациям.

При изучении молекулярного веса фактора XII из крови человека нами применен метод, позволяющий оценивать величину молекулярного веса белка без предварительной его обработки. На основании предыдущих исследований (⁷), в которых показано, что полидекстрановый гель сефадекса не адсорбирует и не активизирует фактор Хагемана, мы использовали гель-хроматографию по (⁸) для определения молекулярного веса этого белка в интактной плазме.

9 объемов крови из локтевой вены смешивали в полиэтиленовых пробирках с 1 объемом $0,1\ M$ раствора тринатрийцитрата. Плазму получали 2-кратным центрифугированием при $105\,000\ g/min$ и температуре 20° . Перед нанесением на колонку для уменьшения вязкости разбавляли плазму $1:1\ 0,15\ M$ раствором KCl.

Для гель-фильтрации применяли стеклянные колонки $2,5 \times 50$ см, покрытые изнутри силиконом и заполненные гелем сефадекса G-100 и G-200. Нанесение образцов и их элюцию проводили согласно методу (⁸). Для калибрования применяли голубой декстран (мол. вес $2\,000\,000$), уреазу (мол. вес $483\,000$), сывороточный альбумин быка (димер, мол. вес $134\,000$), сывороточный альбумин быка (мономер, мол. вес $67\,000$), рибонуклеазу (мол. вес $13\,898$), сахарозу (мол. вес 342). Кроме того, в ходе элюции белков в исследуемой плазме выявляли фибриноген (мол. вес $340\,000$) методом Лоури после свертывания трембином.

Белок в элюате определяли по поглощению при $280\ nm$. Для определения активности фактора XII из каждой фракции элюата ($2,5$ — $3,5$ мл) отбирали по $0,5$ мл и для адсорбции добавляли по $0,3$ мл суспензии каолина в $0,9\%$ растворе NaCl ($40\ mg/ml$). После 10-минутной инкубации при 0° каолин отделяли центрифугированием ($20\,000\ g/min$). Осадок трижды промывали путем ресуспендирования в 3 мл $0,9\%$ раствора NaCl и центрифугировали при 20° . Промытый каолин с адсорбированным фактором XII тщательно ресуспендировали в $0,3$ мл $0,9\%$ раствора NaCl. $0,05$ мл суспензии добавляли к $0,1$ мл кроличьей плазмы, в которой активация

собственного фактора XII была ингибирована добавлением рибонуклеазы 10 мг/мл⁽⁹⁾. Через 2 мин. инкубации при 37° добавляли 0,1 мл 0,025 *M* раствора CaCl₂. Регистрировали время образования фибрина. Параллельно для контроля исследовали время свертывания субстратной плазмы, содержащей ингибиторактивации фактора XII при добавлении к ней такого же количества чистой суспензии каолина. На всех этапах работы с фактором Хагемана использовали только свежесиликонированную посуду или полиэтиленовые пробирки.

В опыте с гель-фильтрацией человеческой плазмы через колонку с сефадексом G-100 установлено, что активность фактора Хагемана выходит

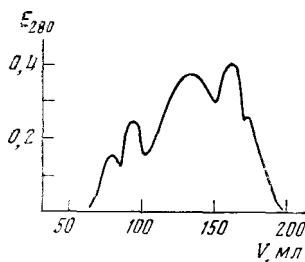


Рис. 1

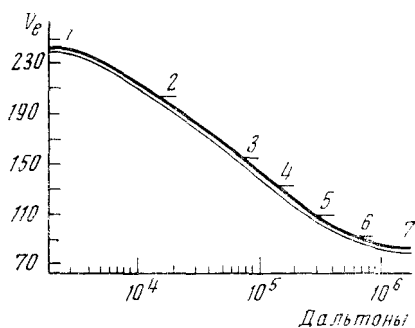


Рис. 2

Рис. 1. Разделение белков плазмы человека на сефадексе G-200

Рис. 2. График зависимости объема элюции белков от молекулярного веса. По оси ординат — объем элюции (в мл), по оси абсцисс — молекулярный вес в логарифмической шкале. Верхняя кривая: 1 — сахароза; 2 — рибонуклеаза; 3 — альбумин; 4 — димер альбумина; 5 — фактор XII; 6 — уреазы; 7 — голубой декстран. Нижняя кривая — из работы⁽⁸⁾

с внешним объемом (V_0). Это свидетельствует о том, что размер молекулы фактора Хагемана, присутствующего в плазме, не позволяет проникнуть и гранулы геля, а молекулярный вес превышает 150 000. Поэтому в последующих опытах был использован гель сефадекса G-200. На рис. 1 приведены результаты хроматографии плазмы крови. Как обычно⁽¹⁾, белки плазмы разделяются на 3 фракции, первая из которых помимо α -липопротеидов содержит и β -(19S)-глобулины. Средняя фракция состоит преимущественно из γ -(7S)-глобулинов, последний пик соответствует сывороточному альбумину. Активность фактора Хагемана выявляется в нисходящей ветви первого пика после фибриногена. Результаты определения элюционных объемов представлены на калибровочном графике (рис. 2).

Как видно, экспериментально полученный график почти идентичен с таковым, взятым из работы⁽⁸⁾. Учитывая разброс результатов отдельных опытов, молекулярный вес фактора Хагемана может колебаться от 255 000 до 316 200, составляя в среднем $286\,000 \pm 18\,000$.

Расчет по формуле Детермана⁽¹⁰⁾ $\lg M = 0,987(V_e/V_0)$, где M — молекулярный вес, V_e — объем выхода, V_0 — холостой объем, дал почти совпадающий результат: 287 000.

На основании представленных результатов можно полагать, что ранее полученные сведения о величине молекулярного веса фактора XII не отражают форму нахождения этого белка в интактной крови человека. Вполне возможно, что неактивная форма фактора Хагемана, циркулирующего в крови, имеет четвертичную структуру либо ассоциирована с каким-то другим плазменным белком. Вероятно, меньший молекулярный вес полученных препаратов фактора XII можно объяснить тем, что во

время очистки происходит разделение субъединиц или отделение белка-спутника. В ходе этих процессов, по-видимому, происходит и физиологическая контактная активация фактора Хагемана.

Казанский государственный
медицинский институт

Поступило
2 VII 1974

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

¹ O. D. Ratnoff, E. W. Davie, *Biochemistry*, v. 1, 977 (1962). ² J. G. G. Schoenmakers, K. Matze, E. Ziliken, *Biochem. et biophys. acta*, v. 101, 166 (1965). ³ C. Haanen, G. Morselt *et al.*, *J. Haematol.*, v. 2, 248 (1965). ⁴ E. F. Mammen, G. Grammens, *Tromb. Diathesis Haemorrhag.*, v. 18, 306 (1967). ⁵ G. Grammens, S. Prosd *et al.*, *ibid.*, v. 25, 405 (1971). ⁶ R. J. Speer, H. Ridgway, J. M. Hill, *ibid.*, v. 14, 1 (1965). ⁷ Л. М. Зубаиров, З. З. Асадулина, Л. Г. Попова, *Пробл. гематол. и перелив. крови*, № 10, 49 (1971). ⁸ P. Andrews, *J. Biochem.*, v. 96, 595 (1965). ⁹ H. L. Nossel, H. Rubin *et al.*, *J. Clin. Invest.*, v. 47, 1172 (1968). ¹⁰ Г. Детерман, *Гель-хроматография*, М., 1970.