

Б. А. КУДРЯШОВ и Е. Е. ЯСКИНА

СРАВНИТЕЛЬНОЕ ИЗУЧЕНИЕ СВОЙСТВ ТРОМБОТРОПИНА И Ас-ГЛОБУЛИНА

(Представлено академиком В. А. Энгельгардтом 4 I 1954)

В ряде предшествующих исследований было показано, что в естественном процессе свертывания крови участвует вещество, названное тромботропином. Тромботропин является «инициатором» свертывания в том смысле, что процесс этот начинается с реакции, в результате которой происходит активирование тромботропином протромбокиназы и превращение последней в тромбокиназу (1-5).

В указанных исследованиях была выявлена видовая специфичность тромботропина и протромбокиназы (3-5). Было также показано, что тромботропин является высокомолекулярным соединением, не диализирующим через коллоидные мембраны и выпадающим из растворов при действии реактивов, осаждающих белки (2). Тромботропин теряет свою активность при нагревании плазмы выше 55° (2). При К-авитаминозной недостаточности у животных концентрация тромботропина в крови резко понижается и быстро восстанавливается в случае парентерального введения таким животным достаточной дозы препарата витамина К (1).

Независимо от перечисленных выше исследований, рядом иностранных авторов было найдено в крови животных и человека вещество, названное лабильным фактором, Ас-глобулином или фактором V (6-11). Было установлено, что это вещество является глобулином, теряющим свою активность при нагревании плазмы до 56—57° (8, 12). При недостатке витамина К в организме животных концентрация Ас-глобулина в крови сохраняется неизменной на физиологическом уровне (13). При введении в организм животных и человека дикумарина в некоторых случаях наблюдалось незначительное снижение концентрации Ас-глобулина в крови (14, 15).

По представлениям разных авторов, биохимическое назначение Ас-глобулина сводится к интенсификации взаимодействия протромбина с тромбопластином (тромбокиназой) при образовании тромбина (8, 10, 16).

До настоящего времени не было получено никаких данных, которые свидетельствовали бы о тождественности или биохимическом различии Ас-глобулина и тромботропина. Настоящее исследование является первой экспериментальной попыткой сравнительного изучения тромботропина и Ас-глобулина.

Материал и методика

Эксперименты проводились на белых крысах. Кровь бралась у животных из яремной вены. Концентрация тромботропина в плазме определялась методом, описанным ранее (1). Определение концентрации Ас-глобулина производилось методом, рекомендованным Квиком (10). Для определения относительной концентрации Ас-глобулина в плазме крыс нами была разработана шкала изменения активности Ас-глобулина в зависимости от его процентного содержания в плазме. За 100% была принята

активность оксалатной плазмы крысы, из которой был удален протромбин обработкой $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ (10) и которая смешивалась с долгохранившейся оксалатной плазмой человека в отношении 1:9. Человеческая плазма использовалась в опыте, если ее протромбиновое время было от 40 до 60 сек., при определении со стандартным крысиным тромбопластином (17, 18).

Для определения 50% концентрации Ас-глобулина, крысиная депротромбинизированная плазма разводилась 1:1 физиологическим раствором NaCl, после чего бралась в анализ. Таким же путем приготавливались 33, 25, 10, 5 и 1-процентные препараты Ас-глобулина крысиной плазмы. При определении нулевой концентрации Ас-глобулина вместо крысиной плазмы брался соответствующий объем физиологического раствора для приготовления смеси с человеческой плазмой.

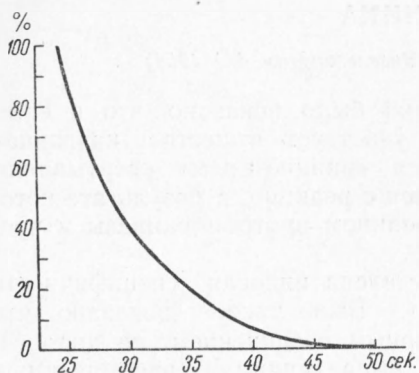


Рис. 1. Время свертывания оксалатной плазмы человека ($t = 37^\circ$) в зависимости от концентрации Ас-глобулина в испытуемой плазме крысы

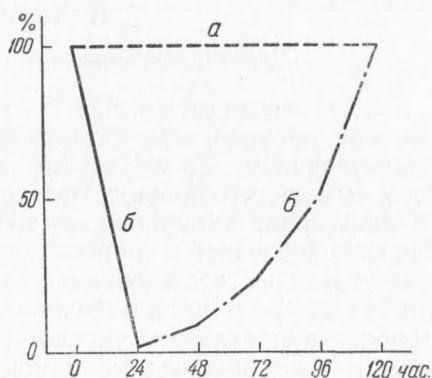


Рис. 2. Средняя концентрация Ас-глобулина (а) и тромботропина (б) в плазме крыс, получивших инъекцию дикумарина

На основании полученных данных был построен график, служивший для определения относительной концентрации Ас-глобулина как в плазме подопытных животных, так и в плазме нормальных крыс, подвергнутой разным экспериментальным воздействиям *in vitro* (см. рис. 1).

Результаты экспериментов

Опыт 1. Тринадцать крысам с весом тела от 150 до 200 г был введен внутримышечно раствор дикумарина из расчета 10 мг на 200 мг веса тела. Перед введением дикумарина и через каждые последующие 24 часа после введения у подопытных животных бралась кровь для определения концентрации тромботропина и Ас-глобулина. Как видно из рис. 2, у животных до введения дикумарина средняя концентрация в плазме тромботропина и Ас-глобулина равнялась 100%. Через 24 часа после введения дикумарина тромботропин почти полностью исчез из плазмы, в то время как Ас-глобулин остался на прежнем физиологическом уровне и сохранялся на этом уровне в течение всего времени опыта (120 час.). Концентрация тромботропина начала медленно восстанавливаться через 48 час. после начала опыта и достигла физиологического уровня только через 120 час.

Следовательно, при введении крысам дикумарина у них нарушается биосинтез тромботропина, в то время как биосинтез Ас-глобулина сохраняется неизменным.

Опыт 2. Цельная оксалатная крысиная плазма, налитая в пробирки, нагревалась в водяной бане при 50° в течение 5, 10 и 15 мин. После нагревания плазма центрифугировалась с целью удаления образовавшегося осадка и переливалась в чистые пробирки. Плазма обрабатывалась

$\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ для удаления протромбина и пускалась в анализ на содержание тромботропина и Ас-глобулина. Результат эксперимента приведен в табл. 1.

Таблица 1

Изменение активности тромботропина и Ас-глобулина после нагревания плазмы крысы

Число опытов	Средн. содерж. до нагревания в %		Т-ра нагревания в °С	Время нагревания в мин.	Средн. содерж. после нагревания в %	
	тромботропин	Ас-глобулин			тромботропин	Ас-глобулин
4	100	100	50	5	79	59
4	100	100	50	10	17,5	38
6	100	100	50	15	7	22

Из данных табл. 1 видно, что тромботропин и Ас-глобулин при нагревании в плазме приблизительно в одинаковой степени подвержены разрушению.

Опыт 3. Из ацетатного буфера с разным значением рН и оксалатной плазмы крыс готовилась смесь в отношении 1:1. После этого определялось рН полученной смеси. Эти образцы плазмы, смешанной с буферными растворами, использовались для определения в них концентрации тромботропина и Ас-глобулина. Полученные данные соответствовали 50% плазме, так как плазма была вдвое разбавлена буферным раствором. По шкале производился пересчет на цельную (100%) плазму. В табл. 2 приведены результаты этого опыта.

Таблица 2

Число опытов	рН плазмы, смешанной с буфером	Средн. содерж. тромботропина в %	Средн. содерж. Ас-глобулина в %
5	7,5*	100	86
5	6,6	130	44
5	5,48	10	18
5	4,96	0	9

* Вместо буферного раствора использован физиологический раствор NaCl.

Из этих данных видно, что только при рН 6,6 наблюдается различное поведение двух изучаемых агентов, при всех же других использованных в опыте значениях рН активность обоих веществ изменяется приблизительно в одинаковой степени.

Опыт 4. Из литературных источников известно, что Ас-глобулин не адсорбируется на $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$. В связи с этим возник вопрос: адсорбирует ли трикальцийфосфат тромботропин? С целью решения этого вопроса было проведено три эксперимента, из которых получены следующие средние данные. До обработки плазмы $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ концентрация тромботропина была равна 100%, после обработки 5%. В то же время обработка плазмы $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ не оказала никакого влияния на содержание в ней Ас-глобулина: концентрация Ас-глобулина сохранилась на уровне 100%.

Отсюда видно, что тромботропин, в отличие от Ас-глобулина, адсорбируется на $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$. Эти данные по адсорбции тромботропина согласуются с итогами ранее проведенных экспериментов Г. В. Андреевко.

Полученные в настоящей работе результаты свидетельствуют о том, что тромботропин и Ас-глобулин являются различными компонентами плазмы, обладающими некоторыми общими физико-химическими свойствами.

Биолого-почвенный институт
при Московском государственном университете
им. М. В. Ломоносова

Поступило
17 VI 1953

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ Б. А. Кудряшов, ДАН, **60**, 1469 (1948). ² Г. В. Андреевко, ДАН, **61**, 1117 (1948). ³ П. Д. Улитина, Б. А. Кудряшов, ДАН, **77**, 673 (1951).
⁴ Б. А. Кудряшов, П. Д. Улитина, ДАН, **84**, 593 (1952). ⁵ Б. А. Кудряшов, Л. И. Муравьева, П. Д. Улитина, ДАН, **88**, 711 (1953). ⁶ А. J. Quick, Am. J. Physiol., **146**, 212 (1943). ⁷ А. J. Quick, M. Stefanini, *ibid.*, **160**, 572 (1950). ⁸ А. G. Ware, W. H. Seegers, *ibid.*, **152**, 567 (1948); J. Biol. Chem., **172**, 699 (1948). ⁹ А. G. Ware, M. M. Goest, W. H. Seegers, *ibid.*, **169**, 231 (1947). ¹⁰ А. J. Quick, The Physiology and Pathology of Hemostasis, 1951.
¹¹ P. A. Owren, Lancet, **252**, 446 (1947); Biochem. J., **43**, 136 (1948). ¹² P. A. Owren, The Coagulation of Blood. Investigation on a New Clotting Factor, Oslo, 1947.
¹³ А. J. Quick, C. V. Hussey, G. E. Collentine, Proc. Soc. Exp. Biol. and Med., **79**, 131 (1952). ¹⁴ J. L. Fahey, J. H. Olwin, A. G. Ware, *ibid.*, **69**, 491 (1948). ¹⁵ С. А. Owen, J. L. Bollman, *ibid.*, **67**, 231 (1948). ¹⁶ А. G. Ware, R. C. Murphy, W. H. Seegers, Science, **106**, 618 (1947). ¹⁷ Б. А. Кудряшов, П. Д. Улитина, А. А. Пугачева, Бюлл. эксп. биол. и мед., **9**, 99 (1941); **9**, 510 (1941). ¹⁸ П. Д. Улитина, Б. А. Кудряшов, ДАН, **63**, 465 (1948).