

щей скачка теплоемкости при переходе «стекло → метастабильная жидкость» и энтальпии испарения исследуемого вещества в предположении, что  $\Delta_d G \approx \Delta_d H$ , и составила  $\Delta_d H(140,0 \text{ K}) = (3,2 \pm 0,3) \text{ кДж} \cdot \text{моль}^{-1}$  [6]. Если принять, что значения  $\Delta_d H$  и  $\Delta_d S$ , рассчитанные на основании температурной зависимости объема жидкого ЦГФ, остаются постоянными в интервале от 315,7 К до 140,0 К, то  $\Delta_d G(140,0 \text{ K}) = 3,87 \text{ кДж} \cdot \text{моль}^{-1}$  и ввиду принятых ранее допущений хорошо согласуются со значением, полученным на основе калориметрических данных.

Согласно [7] энтальпия образования дырок  $\Delta_d H$  и энергия когезии жидкости  $\Delta_{\text{кор}} E$  связаны соотношением

$$\frac{\Delta_{\text{кор}} E}{\Delta_d H} \approx \frac{V_M}{V_d}, \quad (10)$$

где  $(V_M/V_d)$  – среднее отношение мольных объемов молекул и дырок. Энергию когезии жидкости можно оценить на основании энтальпии испарения вещества по формуле  $\Delta_{\text{кор}} E = \Delta_{\text{вар}} H^\circ(T) - RT$ . С учетом средневзвешенного значения  $\Delta_{\text{вар}} H^\circ(283,19 \text{ K}) = (49,77 \pm 0,24) \text{ кДж} \cdot \text{моль}^{-1}$ , полученного по результатам определения энтальпии испарения ЦГФ в дифференциальном микрокалориметре МИД-200 и температурной зависимости давления насыщенного пара, а также разностей теплоемкостей между газом и жидкостью энергии когезии жидкого ЦГФ при 140,0 К и 315,7 К составили соответственно 60,73 кДж · моль<sup>-1</sup> и 44,93 кДж · моль<sup>-1</sup>. Тогда при 140,0 К и 315,7 К отношения мольных объемов молекул и дырок равны соответственно:

$$\frac{V_M}{V_d} = \frac{\Delta_{\text{кор}} E(140,0 \text{ K})}{\Delta_d H(140,0 \text{ K})} = \frac{60,73}{3,2} = 19$$

и

$$\frac{V_M}{V_d} = \frac{\Delta_{\text{кор}} E(315,7 \text{ K})}{\Delta_d H(315,7 \text{ K})} = \frac{44,93}{4,08} = 11.$$

Таким образом, можно предположить, что общее увеличение дырочного объема в жидком ЦГФ ( $N_d V_d$ ) при повышении температуры происходит как за счет роста концентрации дырок, так и за счет увеличения их среднего мольного объема.

1. Блохин А. В., Кабо Г. Я., Кабо А. Г. // Журн. физ. химии. 2000. Т. 74. С. 812.
2. TRC Thermodynamics Tables, TRC, Texas A&M University: College Station, 1998. d-tables.
3. Wunderlich B. // J. Phys. Chem. 1960. Vol. 64. P. 1052.
4. Connolly M. L. // J. Am. Chem. Soc. 1985. Vol. 107. P. 1118.
5. Аскадский А. А., Матвеев Ю. И. Химическое строение и физические свойства полимеров. М., 1983.
6. Павлечко Е. В. // Физика конденсированных сред: Тез. докл. VII Респ. науч. конф. студ. и асп. Гродно, 1999. С. 193.
7. Hirai N., Eyring H. // J. Polym. Science. 1959. Vol. 37. P. 51.

Поступила в редакцию 22.10.99.

УДК 547.458.1+577.157.2

Ю.А. ЛЕСНИКОВИЧ, В.М. ШКУМАТОВ

## НОВЫЕ ПОДХОДЫ К АНАЛИТИЧЕСКОМУ КОНТРОЛЮ И РАЗДЕЛЕНИЮ ИНДИВИДУАЛЬНЫХ БЕЛКОВЫХ КОМПОНЕНТОВ PPSB-КОМПЛЕКСА

With the help of anion-exchange HPLS and SDS - gel - electrophoresis the quantitative estimation of proenzymes and activated factors in a PPSB-complex is carried out. The data of HPLS are well corresponded with the specification of the factors contents determination on the data of activity determination. For preparative isolation of individual proteins from PPSB-complex the methods of hydrophobic and group-specific chromatography on cholate- and heparin - substituted agaroses are offered.

PPSB-комплекс представляет собой концентрат неактивированных факторов II, VII, IX и X системы свертывания крови. Процесс активации факторов протекает по механизму ограниченного протеолиза, приводящего к избирательному расщеплению полипептидных цепей в присутствии фосфолипидов и ионов  $\text{Ca}^{2+}$  с удалением в ряде случаев пропептидов и пептидов активации. Эти белки в результате посттрансляционной модификации и активации обладают уникальной структурно-функциональной организацией: 1) являются N- и O-гликозилированными; 2) имеют сходную доменную структуру – каталитический (протеолитический) домен, два домена, близких по первичной структуре с эпидермальным фактором роста, домен, содержащий остатки  $\gamma$ -карбоксиглутаминовой кислоты (Gla); 3) относятся к семейству трипсиноподобных протеиназ, обладающих строгой специфичностью по расщеплению пептидных связей (Arg-Ile, Arg-Thr); 4) “легкие” и “тяжелые” полипептидные цепи активированных факторов имеют внутри- и межцепочечные дисульфидные связи [1–9]. Комплементарные, высокоаффинные межмолекулярные белок-белковые и белок-эффекторные взаимодействия, уникальная субстратная специфичность обуславливают каскад ферментативных реакций, протекающих в норме как процесс свертывания крови. Нарушения этих молекулярных механизмов, вызванные даже единичными заменами аминокислот в первичной структуре, например фактора IX (замены в положениях 43 и 46 (здесь и далее нумерация дана для аминокислотных остатков предшественников факторов), которые предотвращают выщепления пропептида, мутация в положении 93, приводящая к потере способности связывания с клеточной мембраной, замены в положениях 191 или 226, препятствующие отделению пептида активации и так далее по всей молекуле фактора IX) приводят к тяжелым, средним или легким формам гемофилии Б [10]. Близкие физико-химические свойства: молекулярная масса (56–72 кДа), изоэлектрическая точка (pI 4,1–4,6), наличие остатков Gla и углеводных компонентов приводят к тому, что разделение компонентов PPSB-комплекса и получение отдельных факторов в гомогенном состоянии, что крайне необходимо для избирательной заместительной терапии различных форм нарушения свертывания крови, значительно затруднено. Для выделения и очистки индивидуальных факторов PPSB-комплекса применяют различные схемы, включающие анионообменную хроматографию, аффинную хроматографию с использованием ковалентно связанных с агарозой лигандов: гепарина и моноклональных антител, а также группоспецифические методы с использованием металлохелатной хроматографии и хроматографии на иммобилизованных красителях [11–15]. При оценке содержания факторов применяют непрямые методы определения ферментативной активности с использованием синтетических пептидных субстратов. В итоге из-за неполной активации проферментов, неоптимизированных кинетических условий проведения реакций, а также присутствия активирующих и/или ингибирующих соединений могут возникнуть искажения конечного результата и уровень факторов будет оценен неточно.

Цель настоящей работы заключалась в анализе содержания отдельных компонентов PPSB-комплекса с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии высокого давления (ВЭЖХВД) в сравнении с методом гелелектрофореза в денатурирующих условиях и на основе такого аналитического подхода – в применении различных хроматографических сорбентов для селективного выделения индивидуальных факторов этого комплекса.

#### Материал и методика

В работе использованы: додецилсульфат натрия, 2-меркаптоэтанол, кумасси голубой G-250, натриевая соль холевой кислоты, *трис*-(гидроксиметил)аминометан (“Serva”, Германия); сефароза 4B (“Loba feinchemie”, Германия); цианоборгидрид натрия (“Fluca”, Швейцария); твин 20, белки-стандарты (в скобках даны значения молекулярных масс, кДа): карбоангид-

раза (29), миоглобин (17,2),  $\alpha$ -лактальбумин (14,2), альбумин (67), овальбумин (45), химотрипсиноген (25), цитохром с (12,3) ("Sigma", США); сефароза CL-4B; сефадекс G-150 ("Pharmacia", Швеция); N,N,N',N' – тетраметилэтилендиамин, глицин, акриламид, N,N-метилена-бис-акриламид, персульфат аммония, голубой декстран (2000 кДа), лизоцим ("Reanal", Венгрия). Препарат PPSB – комплекс ("Интерсеро", Германия), содержащий смесь факторов свертывания крови IX, II, VII, X с общими активностями 1309, 984, 320 и 903 Международных единиц (МЕ) соответственно. Препарат "Alphanine" 50 МЕ фактора IX на 1 мл; препарат "Антитромбин III-альфа" 50 МЕ/мл ("Alpha Therapeutic", Германия). Для спектрофотометрического определения содержания белков использовали следующие значения  $A_{280\text{ нм}}^{1\%}$ : протромбин (15,5), проконвертин (13,8), фактор IX (13,4), фактор X (12,4), антитромбин III (6,5). Пентозанполисульфат, натриевая соль 100 мг/мл (далее ППС) ("Bene-Arzneimittel", Германия). Раствор натриевой соли гепарина 5000 МЕ/мл (АО "Белмедпрепараты", Беларусь); сухой гепарин ("Spofa", Чехия).

*Получение холат-сефарозы* [16]: сефарозу CL-4B активировали эпихлоргидрином и аминировали этилендиамином; полученное аминоэтильное производное содержало 10–11 мкмоль первичных аминогрупп в 1 мл осевшего геля. К 33 % (по объему) суспензии геля в сухом диоксане добавляли хелевую кислоту и N,N-дициклогексилкарбодиимид (конечные концентрации соответственно 0,08 и 0,1 М). Реакционную смесь перемешивали 5 ч при 20 °С, затем гель промывали диоксаном, метанолом и водой. Полученный сорбент не давал положительной реакции с тринитробензолсульфоновой кислотой, что свидетельствовало о количественном ацилировании первичных аминогрупп хелевой кислотой.

*Иммобилизацию гепарина* на сефарозе 4В проводили по методу [17] с модификациями. Активированную эпихлоргидрином сефарозу 4В аминировали 1,5 объемами  $\text{NH}_4\text{OH}$ , после промывки высушивали на фильтре и суспензировали в 0,2 М калий-фосфатном буфере (pH 7,0), содержавшем 30 мг гепарина и 3 мг цианоборгидрида натрия на 1 г сефарозы. Иммобилизацию проводили при комнатной температуре и постоянном перемешивании в течение 48 ч, затем добавляли еще 3 мг  $\text{NaCNBH}_3$  из расчета на каждый грамм сефарозы и дополнительно инкубировали 12 ч. Полученную таким образом гепарин-сефарозу использовали для проведения жидкостной хроматографии низкого давления.

*Гель-электрофорез в денатурирующих условиях проводили по методу* [18] в 10 %-м полиакриламидном разделительном геле. После проведения электрофореза гели помещали на 30 мин в 10 %-ю трихлоруксусную кислоту, затем отмывали смесью изопропанол:уксусная кислота:вода (1:2,5:7,5) и окрашивали 0,1 %-м раствором кумасси голубого G-250 в 3,5 %-м растворе  $\text{HClO}_4$ . Для концентрирования белковых растворов перед гель-электрофорезом и ВЭЖХ применяли ультрафильтрационные центрифужные пробирки с разделяющей границей по молекулярной массе 10 кДа ("Cent-ricon C 10", "Amicon"); центрифугирование проводили в течение 10 мин при 8000 об/мин.

*Хроматографию низкого давления проводили с использованием автоматической системы "Градифрак" ("Pharmacia Biotech AB", Швеция) в режимах градиентного или изократического элюирования по заданным программам. Хроматографию гидрофобных взаимодействий осуществляли на колонке (1x5 см) с холат-сефарозой, используя обратный градиент сульфата аммония от 30 %-го до 0 %-го насыщения в 0,005 М *трис*-HCl буфере (pH 7,0). Хроматографию на колонке (0,5x5 см) с гепарин-сефарозой проводили в 0,01 М калий-фосфатном буфере (pH 7,3), линейные градиенты создавали растворами пентозанполисульфата натрия 2 мг/мл, 2 М NaCl или гепарина 200 МЕ/мл в том же буфере от 0 %-го до 100 %-го в течение 2 ч. Скорость потока элюента составляла 0,2 мл/мин.*

Высокоэффективную жидкостную хроматографию высокого давления проводили на приборе фирмы "Shimadzu" (Япония) с применением матрицы диодного излучения SPD-M10A в диапазоне длин волн 240–300 нм. Использовали анионообменную колонку (125x4 мм) ET NUCLEOSIL 4000-7 PEI ("Macherey-Nagel", Германия). Хроматографическая система: элюент А – 0,01 М *трис*-HCl (pH 8,0) и элюент Б – 0,02 М *трис*-HCl (pH 8,0) с 1,5 М NaCl. Градиент от 10 %-го Б до 100 %-го Б в течение 30 мин. Скорость потока элюента – 1 мл/мин. Аналитический вариант хроматографии гидрофобных взаимодействий проводили на колонке TSK Phenyl – 5PW (7,5x75мм) ("LKB", Швеция). Для анализа смесей основных белков использовали катионообменную колонку (8x46мм) NUCLEOSIL SCX ("Macherey-Nagel", Германия).

Спектральные измерения проводили на спектрофотометре UV-1202 ("Shimadzu", Япония) с использованием программы регистрации спектров поглощения.

### Результаты и их обсуждение

Высокоэффективная жидкостная хроматография высокого давления PPSB-комплекса.

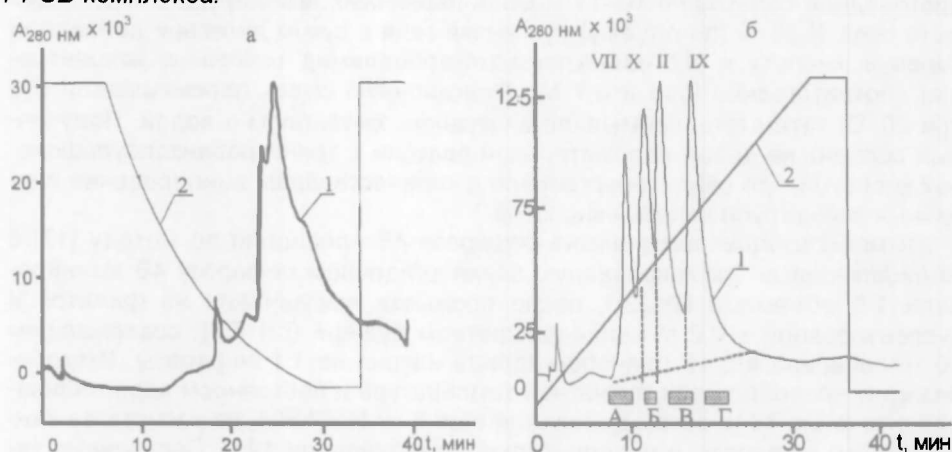


Рис. 1. ВЭЖХВД белков PPSB-комплекса:

а – гидрофобная хроматография на колонке (75x7,5 мм) TSK Phenyl-5PW. б – анионообменная хроматография на колонке (125x4 мм) ET Nucleosil 4000-7 PEI. А, Б, В, Г – объединенные фракции. 1 – поглощение при 280 нм, 2 – форма градиентов

На рис. 1 представлены данные ВЭЖХВД в вариантах гидрофобной (а) и анионообменной (б) хроматографии. Несмотря на то, что катионообменная хроматография низкого давления на сульфопропил-сефадексе была использована для заключительной очистки фактора VII [19], применение сильного катионообменника с привитыми остатками сульфоновой кислоты (Nucleogel SCX 1000-8/46) в варианте ВЭЖХВД не позволило добиться удовлетворительного разделения факторов (данные не приведены). Гидрофобная ВЭЖХВД (силикагель с фенильными остатками, TSK Phenyl-5PW) в нативных условиях с применением обратного экспоненциального градиента концентрации сульфата аммония (кривая 2 на рис. 1а) также приводила к неполному разделению. Как и предполагалась на основании значений  $pI$ , наилучшие результаты были получены нами при использовании анионообменной хроматографии на полиэтиленимино-содержащем носителе (Nucleosil 4000-7 PEI) (рис. 1б). При этом, если в работе [20] с использованием диэтиламиноэтил-целлюлозы в варианте обычной хроматографии отмечалось лишь отделение фактора VII, а факторы II, IX и X получали в виде смеси без разделения, то в случае ВЭЖХВД наблюдалось четкое разделение всех четырех факторов.

Для идентификации фракций пиков (А–Г) на рис. 1б с индивидуальными белками PPSB-комплекса использовали ВЭЖХВД высокоочищенных стандартных факторов II и IX, а также гель-электрофорез в денатурирующих условиях. В таблице приведены время удержания, значения кажущихся молекулярных масс проферментов и возможных продуктов их активации, которые регистрируются при гель-электрофорезе после восстановления дисульфидных связей в виде минорных “тяжелых” и “легких” цепей. Из данных таблицы следует, что определение содержания индивидуальных факторов методом ВЭЖХВД (интегрирование пиков) соответствует данным спецификации компонентов PPSB-комплекса по активности. Нами установлено, что фактор VII имеет 2–3 % активированной формы (протеолиз по связи Arg 212–Ile 213). Активация фактора IX сопровождается протеолитическим расщеплением пептида активации Ala 192–Ile 226 с образованием “тяжелой” цепи (Val 227–Thr 461) и “легкой” цепи (Tyr 47–Arg 191), минорные количества которых удалось зафиксировать при гель-электрофорезе фракции Г после восстановления образца белка 2-меркаптоэтанолом. Гель-электрофорез фракции В позволил установить, что фактор II также имеет примеси активированной формы (до 5 %). Исходный препарат PPSB-комплекса после обработки 2-меркаптоэтанолом характеризовался наличием трех полипептидных цепей в районе молекулярных масс 55–75 кДа и нескольких минорных полипептидов в районе 38–15 кДа соответственно (см. таблицу). Совокупность полученных данных свидетельствует о том, что как исходный препарат PPSB-комплекса, так и выделенные в индивидуальном виде его компоненты содержат активированные формы. Помимо возможной незначительной активации проферментов в процессе получения PPSB-комплекса, это может быть обусловлено также и тем, что фактор VII в форме профермента способен гидролизовать ряд синтетических субстратов и обладает низкой свертывающей активностью [20]. Следует подчеркнуть, что несмотря на частичную активацию проферментов при ВЭЖХД, мы наблюдали только четыре пика, поскольку в нативных условиях продукты активации связаны дисульфидными связями.

**Выход, молекулярные массы (кДа) полипептидных фрагментов и значения активностей компонентов PPSB-комплекса**

| Фракция ВЭЖХВД | Время удержания, мин | Выход, % | Активность, МЕ | Молекулярная масса (кДа) по данным гель-электрофореза |                      | Фактор свертывания |
|----------------|----------------------|----------|----------------|-------------------------------------------------------|----------------------|--------------------|
|                |                      |          |                | без 2-меркаптоэтанолом                                | с 2-меркаптоэтанолом |                    |
| А              | 9,9                  | 15       | 320            | 60                                                    | 60, 30, 18           | VII                |
| Б              | 12,1                 | 22       | 903            | 56                                                    | В                    | Х                  |
| В              | 13,7                 | 28       | 984            | 72                                                    | 72, 38, 26           | II                 |
| Г              | 17,3                 | 35       | 1304           | 57, 46                                                | 57, 28, 17           | IX                 |

Примечание. а – Рассчитывали по площади пиков с учетом коэффициентов поглощения  $\epsilon_{280}^{\%}$  для индивидуальных факторов; б – значения по данным спецификации исходного PPSB-комплекса; в – для данного фактора анализ не проводили; \* – минорные компоненты (2–5 %) по данным денситометрического сканирования гелей при 620 нм.

содержания кислоторастворимых пептидов и аминокислот при ВЭЖВД. Поэтому при разработке схем получения индивидуальных факторов с исполь-

Таким образом, низкомолекулярные полипептидные цепи (15–35 кДа) в препарате PPSB-комплекса до разделения ВЭЖХВД обусловлены как субъединичным составом фактора X, так и продуктами частичной эндогенной активации проферментов. В специальных экспериментах мы установили, что выдерживание при 37 °С в присутствии ионов  $\text{Ca}^{2+}$  приводит к кинетически зависимому увеличению содержания “легких” и “тяжелых” цепей активированных факторов и низкомолекулярных продуктов необратимого расщепления, что сопровождается уменьшением выхода неактивированных факторов и увеличением

зованием в качестве исходного материала PPSB-комплекса необходимо соблюдать условия, препятствующие активации проферментов, – введение ингибиторов протеиназ трипсинового типа, хелаторов ионов  $\text{Ca}^{2+}$ , пониженную температуру – и минимизировать время и количество стадий очистки и выделения.

*Подходы к селективному выделению компонентов PPSB-комплекса.* Элюиционные профили разделения компонентов PPSB-комплекса колоночной хроматографией низкого давления с использованием гепарин-сефарозы и холат-сефарозы приведены на рис. 2б и рис. 3 соответственно. Холат-сефароза была адаптирована ранее для выделения гидрофобных, мембраносвязанных форм цитохромов P-450 различной субстратной специфичности [16, 21]. Установлено, что без высаливающего эффекта сульфата аммония белки PPSB-комплекса не взаимодействуют с носителем и элюируются в свободном объеме, что вполне объяснимо, исходя из наличия большого количества заряженных аминокислотных остатков в молекулах неактивированных факторов. Уравновешивание колонки *трис*-HCl буфером (pH 7), содержащим 30 % от насыщения сульфата аммония, сопровождалось 40 %-й сорбцией белкового материала, элюирование которого достигнуто обратным градиентом (30 %→0 %) сульфата аммония (см. рис. 2). Одновременное введение в элюирующий буфер аналога иммобилизованного лиганда – натриевой соли холевой кислоты (0 %→1,5 %) – практически не изменяло характер кривой элюирования. Фракции были объединены как указано на рис. 2, сконцентрированы с помощью ультрафильтрационных центрифужных пробирок до объема 1–2 мл и подвергнуты анализу с помощью анионообменной ВЭЖХВД (колонка ET NUCLEOSIL 4000-7 PEI) и гелеэлектрофореза в денатурирующих условиях. Несмотря на то что объединенные фракции содержали практически индивидуальные факторы, перекрытие пиков приводило к тому, что выход разделенных белков был относительно низок.

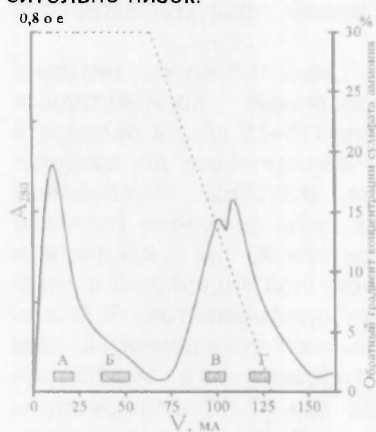


Рис. 2. Профиль элюирования PPSB-комплекса при проведении гидрофобной хроматографии низкого давления на колонке с холат-сефарозой. А, Б, В, Г – объединенные фракции. Линии: сплошная – профиль элюирования белков; пунктирная – изменение концентрации сульфата аммония

В последнее время практически все схемы получения факторов свертывания на заключительных стадиях включают хроматографию на иммобилизованном гепарине [11, 15]; нередко авторы обозначают эту стадию термином аффинная хроматография. В то же время гепарин как линейный полиэлектролит способен взаимодействовать с большим числом различных белков [22]. Ранее нами установлено, что гепарин и его полусинтетический аналог – пентозанполисульфат натрия – способны образовывать в растворах с нейтральными значениями pH и при низкой ионной силе комплексы различной стехиометрии и молекулярной массы практически со всеми компонентами PPSB-комплекса [23]. Существует ряд методов ковалентной иммобилизации гепарина для получения нерастворимых производных, но наиболее приемлемый подход, исходя из соображений максимального сохранения связывающих участков, удельного

содержания лиганда, отсутствия многоточечной модификации и стерических затруднений со стороны носителя, заключается в восстановительном аминировании концевой формильной группы гепарина аминопроизводными агарозы [17]. Нами синтезирован такой вариант гепарин-сефарозы и применен для изучения специфических и неспецифических белок-лиганд-

ных взаимодействий. В качестве модельных использовали щелочные белки: химотрипсиноген, цитохром с и лизоцим. Нанесение смеси этих белков на колонку с гепарин-сефарозой и последующее элюирование линейным градиентом раствора гепарина сопровождалось выходом симметричного пика (см. рис. 3а). Аналогичные результаты были получены при элюировании растворами пентозанполисульфата натрия или NaCl. Ранее нами показано, что по крайней мере пентозанполисульфат является низкоаффинным ингибитором ферментативного восстановления цитохрома с [23]. Следовательно, взаимодействие между щелочными белками и иммобилизованным гепарином осуществляется по механизму неспецифических ионных взаимодействий поверхностно-локализованных положительно заряженных остатков лизина на молекулах белков и сульфатированных остатков молекулы гепарина. Такой же вывод позволяет сделать аналитическая катионообменная ВЭЖХВД с использованием носителя с привитой сульфоновой кислотой (NUCLEOSIL SCX), правда, с идеальным разделением белков в зависимости от их изоэлектрических точек, что обусловлено аналитическим характером хроматографии (100 мкг суммарного белка смеси) и более чем 4000 теоретических тарелок для примененной колонки (см. рис. 3а, вставка). На рис. 3б приведен элюиционный профиль разделения белков PPSB-комплекса с применением гепарин-сефарозы. В свободном объеме колонки элюировалась смесь факторов II, VII и X, а растворимым гепарином элюировался фактор IX с незначительными примесями фактора II. Эти белки являются кислыми, поэтому связывание неактивированных факторов II и IX обусловлено комплексом взаимодействий белков с иммобилизованным гепарином, включающим ионные, водородные и гидрофобные взаимодействия.

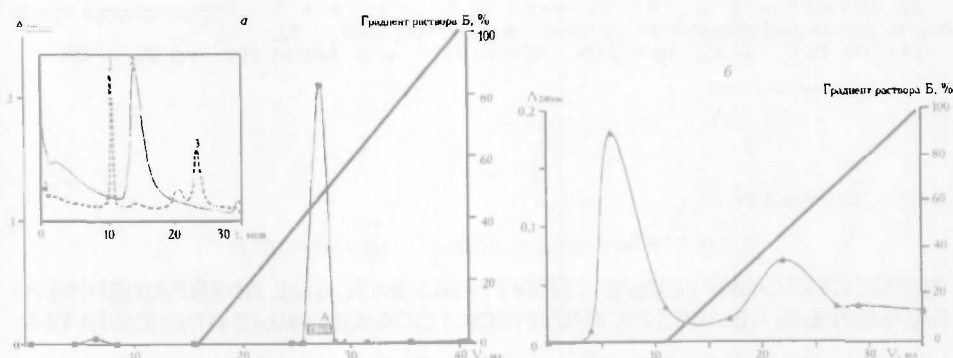


Рис. 3. Взаимодействие смеси белков (лизоцим, химотрипсиноген и цитохром с) (а) и PPSB-комплекса (б) с гепарин-сефарозой. Десорбция белков осуществлялась раствором Б (жирная линия) с концентрацией гепарина до 200 МЕ/мл в 0,01 М калий-фосфатном буфере (рН 7,3). Вставка на рис. 3а – анализ ВЭЖХВД на катионообменной колонке NUCLEOSIL SCX совместно элюированных белков (1 – химотрипсиноген, 2 – цитохром с, 3 – лизоцим; штриховая линия – поглощение при 280 нм, сплошная – поглощение при 412 нм)

Таким образом, предложена аналитическая система анионообменной ВЭЖХВД для определения количественного содержания индивидуальных неактивированных факторов свертывания в PPSB-комплексе, применение которого для терапии гемофилии Б сопровождается побочными эффектами [24]. Получение индивидуальных белков для заместительной терапии различных дефектов свертывания крови осложняется наличием в исходном препарате минорных количеств активированных факторов, которые способны осуществлять глубокую протеолитическую деградацию факторов с уменьшением их выходов при выделении. Применение различных вариантов хроматографии с использованием гепарин-сефарозы оправдано только после предварительных стадий разделения белков PPSB-комплекса и поэтому требует новых подходов, связанных с возможностью тонкого разделения активированных и неактивированных факторов.

1. Leytus S.P., Chung D.W., Kisiel W. et al. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1984. Vol. 81. № 12. P. 3699.
2. Thim L., Bjoern S., Christensen M. et al. // Biochemistry. 1988. Vol. 27. № 20. P. 7785.
3. Davie E.W., Fujikawa K., Kisiel W. // Biochemistry. 1991. Vol. 30. P. 10363.
4. Bajaj S.P., Birktoft J.J. // Methods Enzymol. 1993. Vol. 222. P. 96.
5. Inoue K., Morita T. // Eur. J. Biochem. 1993. Vol. 218. № 1. P. 153.
6. Banner D.W., D'Arcy A., Chene C. et al. // Nature. 1996. Vol. 380. P. 41.
7. Mathur A., Zhong D., Saharwal A.K. et al. // J. Biol. Chem. 1997. Vol. 272. № 37. P. 2148.
8. Christophe O.D., Lenting P.J., Kolkman J.A. et al. // J. Biol. Chem. 1998. Vol. 273. № 1. P. 222.
9. Stanley T.B., Wu S.M., Houben R.J. et al. // Biochemistry. 1998. Vol. 37. № 38. P. 13262.
10. Giannelli F., Green P.M., High K.A. et al. // Nucleic Acids Res. 1993. Vol. 21. № 13. P. 3075.
11. Bajaj S.P., Rapaport S.I., Prodanos C. // Prep. Biochem. 1981. Vol. 11. № 4. P. 397.
12. Hashimoto N., Morita T., Iwanaga S. // J. Biochem. 1985. Vol. 97. № 5. P. 1347.
13. Feldman P.A., Bradbury P.I., Williams J.D. et al. // Blood Coagul. Fibrinolysis. 1994. Vol. 5. № 6. P. 939.
14. Ficher B., Mitterer A., Dorner F. // J. Biotechnol. 1995. Vol. 38. № 2. P. 129.
15. Sugahara Y., Catafamo J., Brooks M. et al. // Tromb. Hemost. 1996. Vol. 75. № 3. P. 450.
16. Juvonen R.-O., Shkumatov V.M., Lang M.A. // Eur. J. Biochem. 1988. Vol. 171. P. 205.
17. Sasaki H., Hayashi A., Kitaagaki-Ogawa H. et al. // J. Chromat. 1987. Vol. 400. P. 123.
18. Weber K., Osborn N. // J. Biol. Chem. 1969. Vol. 244. P. 4406.
19. Rao L.V.M., Bajaj S.P. // Analytical Biochem. 1984. Vol. 136. P. 357.
20. Bajaj S.P., Rapaport S.I., Broun S.F. // J. Biol. Chem. 1981. Vol. 256. № 1. P. 253.
21. Шкуматов В.М., Радюк В.Г., Гапонова Г.И. и др. // Биохимия. 1988. Т. 53. № 12. С. 1962.
22. Farooqui A.A. // J. Chrom. 1980. Vol. 184. P. 335.
23. Шкуматов В.М., Лесникович Ю.А., Рудой А.Л. // Лекарственные препараты на основе модифицированных полисахаридов. Мн., 1998. С. 63.
24. Kim H.C., McMillan C.W., White G.C. et al. // Blood. 1992. Vol. 79. P. 568.

Поступила в редакцию 26.01.2000

УДК 621.793.+546.3-19

Л.И. СТЕПАНОВА, Т.И. БОДРЫХ, В.В. СВИРИДОВ

## ТЕРМОСТИМУЛИРУЕМЫЕ СТРУКТУРНО-ФАЗОВЫЕ ПРЕВРАЩЕНИЯ И БАРЬЕРНЫЕ СВОЙСТВА ХИМИЧЕСКИ ОСАЖДЕННЫХ ПЛЕНОК Ni-W-P

The paper discussed the effect of tungsten inclusion into deposited from hypophosphite solutions Ni-P alloys on regularities of heat-induced structural-phasic and barrier properties.

Известно [1–4], что пленки сплавов Ni-W-P осаждаются из цитратно-гипофосфитных растворов химического никелирования при введении в них вольфрамата натрия. В зависимости от состава раствора (концентрации вольфрамата натрия, соли никеля, цитрата натрия, наличия ионов аммония) и его pH пленки Ni-W-P могут содержать 4–21 ат.% фосфора и 1–8 ат.% вольфрама. В опубликованных работах отмечалось, что пленки названных сплавов по структуре и свойствам существенно отличаются от пленок Ni-P, осажденных из аналогичных растворов. В частности, степень их кристалличности снижается не только при повышении содержания фосфора, но и при возрастании количества вольфрама, при большой концентрации тугоплавкого металла они становятся аморфными, выделение же фосфидной фазы Ni<sub>3</sub>P в результате термообработки в присутствии вольфрама тормозится. До сих пор нет общепринятой точки зрения на то, каким образом вольфрам включается в состав сплавов Ni-W-P: одни авторы [1, 4] предполагают, что вольфрам может включаться в сплавы эвтектически, а другие [2, 3] – утверждают, что тугоплавкий металл встраивается в решетку

