

Архив журнала

## Вопросы медицинской химии

*ISSN 0042-8809*

1985

**Внимание!** Распознавание текста проведено в автоматическом режиме для облегчения работы поисковых систем. Будьте внимательны при копировании, возможны ошибки и неточности. Используйте сканированный графический вариант.

Archive of journal

## Voprosy meditsinskoi khimii

*ISSN 0042-8809*

1985

**Attention!** OCR has been performed automatically for search engines only. Be careful when copying, errors are possible. Use scanned picture as standard.

<http://pbmc.ibmc.msk.ru>

ТОМ XXXI

ВЫПУСК 5

СЕНТЯБРЬ — ОКТЯБРЬ

Двухмесячный научно-теоретический журнал

Основан в 1955 г.

ВОПРОСЫ  
МЕДИЦИНСКОЙ  
ХИМИИ



МОСКВА. МЕДИЦИНА. 1985



РЕДАКЦИОННАЯ КОЛЛЕГИЯ:

Главный редактор С. С. ДЕБОВ

В. И. МАЗУРОВ (зам. главного редактора), Т. Т. БЕРЕЗОВ, Е. Н. ГЕРАСИ-  
МОВА, В. З. ГОРКИН, И. Б. ЗБАРСКИЙ, А. Н. КЛИМОВ, Б. Ф. КОРОВКИН,  
Л. А. ЛОКШИНА, В. Н. ОРЕХОВИЧ, Л. Ф. ПАНЧЕНКО, М. Ш. ПРОМЫСЛОВ,  
Е. Л. РОЗЕНФЕЛЬД, Ю. А. РОМАКОВ (ответственный секретарь), В. А. САКС,  
С. Е. СЕВЕРИН, В. Б. СПИРИЧЕВ

РЕДАКЦИОННЫЙ СОВЕТ:

БАЕВ А. А. (Москва)  
БЕЛИЦЕР В. А. (Киев)  
БЫЧКОВ С. М. (Москва)  
КОНСТАНТИНОВ А. А. (Хабаровск)  
КУДРЯШОВ Б. А. (Москва)  
ЛЯХОВИЧ В. В. (Новосибирск)  
ПАСХИНА Т. С. (Москва)

ТРОИЦКИЙ Г. В. (Симферополь)  
ТАРАКУЛОВ Я. Х. (Ташкент)  
ТЯХЕПЫЛЬД Л. Я. (Тарту)  
УТЕВСКИЙ А. М. (Харьков)  
ШАПОТ В. С. (Москва)  
ЯКОВЛЕВ Н. Н. (Ленинград)  
ЯСАЙТИС А. А. (Вильнюс)

Адрес редакции журнала:

Москва, Солянка, 14

АМН СССР

Тел. 297-16-44

Зав. редакцией Л. А. Фирсова

1983

мер, реопирин) по сравнению с эстроном или тетрациклином. Эти различия обусловлены многими факторами, в частности особенностями фармакокинетики и биотрансформации препаратов. Нельзя также исключить, что снижение ИА через сутки после окончания инъекций эстрона или тетрациклина обусловлено в известной мере увеличением активности деацетилаз.

Таким образом, мы отметили четкую зависимость ИА от концентрации эстрона в организме интактных самок крыс. Вместе с тем однонаправленные изменения ИА, регистрируемые под влиянием гормона, с одной стороны, и тетрациклина или реопирина, с другой, подтверждают распространенные представления о «проксимальном индукторе», которым, как известно, считают половые гормоны. Показано, что андрогены не влияют на ИА [10]. В связи с этим можно предположить, что именно женские половые гормоны определяют активность N-ацетилтрансфераз у интактных крыс. Вместе с тем следует отметить, что полученные данные противоречат таковым, опубликованным в работе [9], где было установлено отсутствие влияния эстрона на ИА у самок крыс. Указанные расхождения мы связываем с тем, что наши исследования проводили в динамике (на протяжении 7—10 сут), в то время как в цитируемой работе изучали влияние эстрона только через сутки после воздействия гормоном.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Буловская Л. Н. Изучение типа ацетилирования при злокачественных новообразованиях и противоопухолевого действия анагормона АКГГ. Автореф. дис. докт. Л., 1980.
2. Головенко Н. Я., Карасева Т. Л. Сравнительная биохимия чужеродных соединений. Киев, 1983, с. 40; 168.
3. Дунаев В. В., Крылов Ю. Ф. — Фармакол. и токсикол., 1964, № 5, с. 531—533.
4. Крылов Ю. Ф., Дунаев В. В. — Там же, 1970, № 1, с. 82—84.
5. Крылов Ю. Ф., Лильин Е. Т., Ванюков М. М. и др. — Там же, 1982, № 4, с. 85—88.
6. Крылов Ю. Ф., Петров В. К. — Там же, 1975, № 4, с. 476—479.
7. Филлипова В. Н., Сейц Н. Ф. — Биохимия, 1958, т. 23, № 1, с. 119—124.
8. Bratton A. C., Marshall E. K. — J. biol. Chem., 1939, v. 128, p. 573—550.
9. Zidek Z., Friebova M., Janku I. et al. — Biochem. Pharmacol., 1977, v. 26, p. 69—70.
10. Zidek Z., Janku J. — Pharmacology, 1979, v. 19, p. 209—211.

Поступила 27.06.84

## INDUCTION OF ACETYLATION IN RAT BY PHARMACOLOGICAL MEANS

E. M. Ryazanov, A. V. Tretyakov, V. A. Alexandrov

M. N. Petrov Research Institute of Oncology, Ministry of Public Health of the USSR, Leningrad

Influence of oestron, tetracycline, reopyrine and phenobarbital on acetylation of sulphadimidine was studied in white female rats. Administration of the above-mentioned drugs caused an increase in the rate of acetylation, which reached the maximal values within the 2-5 days after the last day of administration.

УДК 616.151.514-055.5/.7-07:616.155.25-008.931:577-152.2

Я. М. Соковнина, Т. Б. Мареева, О. П. Плющ, И. Н. Вотрин

## АДЕНИНФОСФОРИБОЗИЛТРАНСФЕРАЗА И ГИПОКСАНТИН-ГУАНИНФОСФОРИБОЗИЛТРАНСФЕРАЗА ТРОМБОЦИТОВ КРОВИ ПРИ НАСЛЕДСТВЕННЫХ КОАГУЛОПАТИЯХ

НИИ медицинской энзимологии АМН СССР, Москва

Изучение особенностей пуринового и пиримидинового обмена в тромбоцитах при наследственных тромбоцитопатиях необходимо для выяснения возможных причин функциональной неполноценности тромбоцитов и понимания патогенеза этих заболеваний. Тромбоциты как объект исследования привлекают внимание многих специалистов не только потому, что они играют решающую роль в гемостазе, но и потому, что они вовле-

чены в работу молекулярно-клеточных систем организма, определяющих состояние сосудов, воспалительной и других физиологических реакций.

Среди наследственных заболеваний, сопровождаемых нарушением в системе свертывания крови, гемофилия является одним из тяжелых заболеваний, связанной с врожденным нарушением плазменных факторов свертывания крови. Выделяют две основные формы заболе-

вания: гемофилия А (недостаточность фактора VIII) и гемофилия В (недостаточность IX фактора). Обе формы наследуются по рецессивному, сцепленному с X-хромосомой типу [11].

Исследования последних лет свидетельствуют, что целый ряд заболеваний, таких как подагра [7—9], синдром Леша — Нихена [10, 13], возникновение различных форм анемий [20] сопровождаются изменением в активности аденинфосфорибозилтрансферазы (АФРТ) и гипоксантин-гуанинфосфорибозилтрансферазы (ГГФРТ) в форменных элементах крови.

Установлено уменьшение АФРТ и ГГФРТ при хроническом лимфолейкозе в лимфоцитах и увеличение в лейкомиических гранулоцитах [5, 16, 17].

Имеются данные о повышении уровня АФРТ в эритроцитах при врожденном нарушении пиримидинового метаболизма, оротикоацидурии [21].

В литературе последних лет описаны случаи врожденной недостаточности АФРТ. Мутации, приводящие к полной потере ферментативной активности в эритроцитах детей, вызывают ряд серьезных дефектов в метаболизме аденина, сопровождаемых образованием совершенно нового вещества — 2,8-оксиаденина, а не мочевой кислоты, что ведет к образованию камней в почках. В тех случаях, когда уровень АФРТ в эритроцитах гетерозигот составляет 50% от уровня его в норме, особых клинических проявлений не наблюдали [3, 4, 6, 18].

В настоящее время ферменты обмена пуринов интенсивно изучают в форменных элементах крови (эритроцитах, лимфоцитах) в биохимическом, генетическом и медицинском аспекте при разных патологических процессах. Однако энзиматические пути синтеза нуклеотидов в тромбоцитах при наследственных коагулопатиях, в частности при гемофилии, не изучены.

Настоящая работа посвящена изучению активности двух ключевых ферментов обмена пуринов — АФРТ (КФ 2.4.2.7) и ГГФРТ (КФ 2.4.2.8) тромбоцитов крови при гемофилии А и В.

### Методика

Активность АФРТ и ГГФРТ, катализирующих превращение свободных азотистых оснований аденина, гипоксантина и гуанина в их соответствующие нуклеотиды АМФ, ИМФ и ГМФ в присутствии фосфорибозилпирофосфата (ФРПФ), определяли в тромбоцитах доноров и больных гемофилией А и В.

Тромбоциты выделяли методом центрифугирования на Фиколе — Пак. В качестве антикоагулянта использовали 2% ЭДТА в 0,9% NaCl pH 7,3—7,4. Выделенные тромбоциты разрушали озвучиванием, центрифугировали при 25 000 g в течение 20 мин и надосадочную жидкость использовали для определения ферментативной активности. ФРПФ получали по методу Кориберга в модификации В. Н. Филипповой и соавт. [2], а также использовали коммерческий препарат фирмы «Boehringer».

Определение ферментативной активности проводили в условиях линейной зависимости от концентрации субстрата, ФРПФ, количества фермента и времени инкубации.

Опытные пробы общим объемом 300 мкл содержали: (8-<sup>14</sup>C)-аденин — 50 мкл (удельная радиоактивность 40 мКи/мл), ФРПФ — 50 мкл (0,1 мкмоль), 10 mM трис-HCl pH 7,4 с 5 mM MgSO<sub>4</sub> при содержании белка в пробе 20—30 мкг. Пробы инкубировали 15 мин при 37 °C. Реакцию останавливали 96% спиртом, 200 мкл. До исследования ферментативной активности АФРТ проводили диализ в течение ночи против 10 mM трис-HCl буфера pH 7,4, содержащего 5 mM MgSO<sub>4</sub>.

В тех опытах, когда проводили определение ГГФРТ, вместо аденина использовали (8-<sup>14</sup>C)-гипоксантин (14,5 мКи/мл) или (8-<sup>14</sup>C)-гуанин (70 мКи/мл). Радиоактивность образовавшихся в ходе ферментативной реакции нуклеотидов АМФ, ИМФ, ГМФ определяли на автоматическом линейном анализаторе (модель «Berthold» 1024) после разделения смеси продуктов методом тонкослойной хроматографии в системе растворителей 1 M ацетата аммония pH 7,4: спирт 96%, в отношении 3 : 7. Удельную активность выражали в наномолях образовавшегося продукта на 1 мг белка в 1 час. Белок определяли по методу Лоури [12].

### Результаты и обсуждение

Всего обследовано 18 доноров и 22 больных гемофилией А и В. В комплекс обследования входило определение прокоагулянтной активности факторов VIII и IX, агрегации тромбоцитов в присутствии ристомидина и времени кровотечения. Среди обследованных больных гемофилией А наблюдали снижение уровня фактора VIII (средние значения

Активность АФРТ и ГГФРТ тромбоцитов доноров и больных гемофилией А и В

Название болезни	Удельная активность, пмоль на 1 мг белка в 1 ч		
	АФРТ	ГГФРТ	ГФРТ
Гемофилия:			
А	134,6 ± 1,5 (n = 12)	98 ± 8,6 (n = 12)	289 ± 8,9 (n = 4)
В	210,0 ± 8,2 (n = 10)	117 ± 12,3 (n = 8)	299 ± 4,2 (n = 4)
Доноры	235,0 ± 2,35 (n = 18)	222 ± 4,8 (n = 19)	266 ± 13,4 (n = 8)

Примечание. ГГФРТ — гипоксантинфосфорибозилтрансфераза, ГФРТ — гуанинфосфорибозилтрансфераза.

1,5%; норма 50—200%), при нормальном факторе IX. У больных гемофилией В снижение фактора IX в среднем составляло 2,5%; норма 50—200%. Агрегация тромбоцитов и время кровотечения были в пределах нормы при обеих формах гемофилии.

В таблице приведены результаты определения активности АФРТ и ГКФРТ в тромбоцитах крови доноров и при наследственных коагулопатиях.

Данные, полученные при исследованиях тромбоцитов доноров, соответствующим литературным [11, 15].

В результате проведенных исследований были выявлены особенности изменений активности исследованных ферментов в тромбоцитах при гемофилии А и В. Активность АФРТ составляла 57% при гемофилии А в сравнении с активностью в норме. Обращает на себя внимание тот факт, что при гемофилии В активность указанного фермента была в пределах нормы.

Активность ГКФРТ при гемофилии А составляла 44% от активности его в норме. Аналогичное снижение ГКФРТ (52%) наблюдали и при гемофилии В. Уменьшение активности ГКФРТ при обоих видах гемофилии подчеркивает важную функциональную роль этого фермента в общем метаболизме.

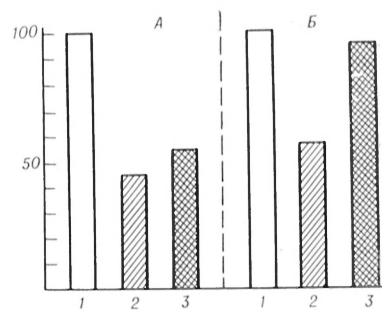
Нормальный уровень фермента был отмечен при обоих типах гемофилии, когда в качестве субстрата использовали гуанин.

Возможно, АФРТ и ГКФРТ не являются этиологическими факторами заболевания гемофилией, но обнаруженный нами биохимический дефект в активности АФРТ дает возможность использовать его для дифференциации различных форм гемофилии, а определение активности ГКФРТ можно рассматривать в качестве генетического маркера этого заболевания.

Данные, полученные нами при определении ГКФРТ в тромбоцитах больных гемофилией, послужили основанием для использования этого фермента в целях возможного выявления женщин — носительниц патологического гена гемофилии, что имеет важное значение для медико-генетического консультирования.

Проблема разработки ферментных тестов, позволяющих выявлять гетерозиготных носителей, до сих пор остается весьма актуальной.

Нами было обследовано 9 семей, в ко-



Активность АФРТ, ГФРТ тромбоцитов в норме, при гемофилии А и у женщин — носительниц патологического гена.

А — активность ГКФРТ, Б — активность АФРТ; 1 — норма; 2 — гемофилия А, 3 — гетерозиготные носители. По оси ординат — активность, %.

торых сыновья были больны гемофилией А и, следовательно, все матери являлись носительницами заболевания и имели риск как рождения больных сыновей, так и риск носительства для девочек.

Результаты, полученные при обследовании (см. рисунок), демонстрируют снижение активности ГКФРТ в тромбоцитах женщин-носительниц. Активность этого фермента составляла в среднем  $125,2 \pm 9,4$  нмоль на 1 мг белка в 1 ч, т. е. 59% от его активности в норме ( $222 \pm 4,8$  нмоль на 1 мг белка в 1 ч), подтверждая предположение о том, что все матери являются гетерозиготными носителями гена гемофилии. Нам удалось выявить в ряде семей также девочек — носительниц гемофилии, у которых, как и у матерей, был снижен уровень ферментативной активности (98,4 и 87,6 нмоль на 1 мг белка в 1 ч соответственно). Однако следует отметить, что у гетерозиготных носительниц активность АФРТ оставалась в пределах нормы.

Итак, в настоящей работе мы отметили факт уменьшения ГКФРТ как в тромбоцитах больных гемофилией, так и у женщин — гетерозиготных носительниц, что заслуживает особого внимания в свете дальнейшего возможного использования определений активности указанного фермента в качестве генетического маркера гемофилии и в целях тестирования гетерозиготных носительниц для предупреждения рождения больных детей. Комбинированное использование различных методов исследования (определение факторов свертывания крови, использование иммунологических и биохимических тестов) может повысить точность выявления носительства гена гемофилии.

Генетический механизм, ведущий к недостаточности АФРТ и ГКФРТ у цело-

века, не изучен в достаточной степени. Структурные гены, кодирующие эти ферменты, локализованы в различных хромосомах: АФРТ в 16 хромосоме [19], а ГКФРТ в X-хромосоме [14], как и гены, ответственные за синтез факторов VIII и IX, мутация которых приводит к нарушению процессов свертывания крови. Поскольку мутация в структурном гене ГКФРТ, помимо гемофилии, вызывает целый ряд других заболеваний (подагра, синдром Леша — Нихена), можно сделать предположение о разнообразии возникающих мутаций в локусе ГКФРТ, что подчеркивает генетическую гетерогенность мутаций. По-видимому, один генетический локус не может быть ответственным за развитие заболевания. Мультифакториальное наследование, включающее изменение множества генетических локусов и большого числа внешних факторов, определяет подверженность конкретному заболеванию.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Баркаган З. С. Геморрагические заболевания и синдромы. М., 1983.
2. Филиппова В. П., Филиановская Л. И., Блинов М. И. — Вopr. мед. химии, 1975, № 6, с. 663—665.
3. Barratt T. M., Simmonds H. A., Cameron J. S. et al. — Arch. Dis. Child, 1979, vol. 54, p. 25—31.
4. Cartier P., Hamet M., Vingens A., Perigon J. L. — Advanc. exp. Med. Biol., 1980, vol. 122-A, p. 343—348.
5. Dietz A. A., Czebohar V. — Cancer. Res., 1977, vol. 37, p. 419—426.
6. Doppler W., Hirsch-Kauffmann M., Schabel F., Schweiger M. — Hum. Genet., 1981, vol. 57, p. 404—410.
7. Fox J. H. — J. clin. Invest., 1975, vol. 56, p. 1239—1249.
8. Gutensohn W. — Europ. J. clin. Invest., 1979, vol. 9, p. 43—47.
9. Gröbner W., Gutensohn W. — Advanc. exp. Med., Biol., 1980, vol. 122-A, p. 313—317.
10. Iliaba K. — Biochem. Med., 1978, vol. 19, p. 252—259.
11. Jerushalmay Z., Sperling O., Pinkhas J. et al. — Haemostasis, 1972/1973, vol. 1, p. 279—284.
12. Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L. et al. — J. biol. Chem., 1951, vol. 193, p. 265—275.
13. Müller M. M. — Advanc. exp. Med. Biol., 1973, vol. 41, p. 187—194.
14. Nabholz M., Miggiano V., Bodmer W. — Nature, 1969, vol. 223, p. 358—368.
15. Rivard G. E., McLaren J. D., Brunst R. F. — Biochim. biophys. Acta, 1975, vol. 381, p. 144—156.
16. Rambolli P., Davis S. — J. Haemat., 1981, vol. 49, p. 23—28.
17. Scholar E. M., Calabresi P. — Cancer. Res., 1973, vol. 33, p. 94—103.
18. Simmonds H. A. — Advanc. exp. Med. Biol., 1980, vol. 122-A, p. 337—341.
19. Tischfield J. A., Ruddli F. H. — Proc. nat. Acad. Sci. USA, 1974, vol. 71, p. 45—49.
20. Valentine W. N., Anderson H. M., Paglia D. E. et al. — Blood, 1972, vol. 39, p. 674—684.
21. Wilson J. M., Daddona P. E., Oloades T., Kelley W. N. — J. Lab. clin. Med., 1982, vol. 99, p. 163—174.

Получила 05.07.84

#### ADENINE PHOSPHORIBOSYLTRANSFERASE AND HYPOXANTHINE-GUANINE PHOSPHORIBOSYLTRANSFERASE OF BLOOD THROMBOCYTES IN HEREDITARY THROMBOCYTOPATHIES

Ya. M. Sokovnina, T. B. Mareeva, O. P. Plyusch, I. I. Voltrin

Institute of Medical Enzymology, Academy of Medical Sciences of the USSR, Moscow

Activities of adenine phosphoribosyltransferase (EC 2.4.2.7 APRT) and hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase (EC 2.4.2.8 HGPRT) were studied in thrombocytes of healthy donors, patients with hemophilia A and B and of women — heterozygote carriers of the pathologic gene. The data obtained suggest that HGPRT test may be used as a genetic marker of hemophilia as well as to detect the heterozygote carriers; estimation of APRT activity is suitable test for differentiation of hemophilia forms.

УДК 616.36-008.51-02:616.361-003.7-085.38.015.2:615.246.2/-036.8-074

Б. Л. Лурье, С. И. Репина, Б. И. Корнев, А. И. Лобаков,  
М. М. Кочетова

#### ПРИМЕНЕНИЕ ОБОБЩЕННОГО БИОХИМИЧЕСКОГО ПАРАМЕТРА ДЛЯ ОЦЕНКИ ЭФФЕКТИВНОСТИ ГЕМОСОРБЦИИ У БОЛЬНЫХ С МЕХАНИЧЕСКОЙ ЖЕЛТУХОЙ КАЛЬКУЛЕЗНОГО ГЕНЕЗА

И ММИ им. Н. И. Пирогова, МОНИКИ им. М. Ф. Владимирского

В последние годы широкое применение в клинической практике нашел метод сорбционной детоксикации больных с механической желтухой путем гемо- и лимфосорбции [3, 5]. При этом из организма удаляются значительные

количества эндогенных токсинов, имеющих отношение к клиническим проявлениям, а также (что особенно важно) оказывающих повреждающее влияние на печень. Это способствует улучшению клинического состояния и сни-