

Научно-исследовательский институт биомедицинской химии имени В.Н.Ореховича

Архив журнала

Вопросы медицинской химии

ISSN 0042-8809

1986

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

1986

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 XXXII

ВЫПУСК 2

МАРТ—АПРЕЛЬ

Двухмесячный научно-теоретический журнал

Основан в 1955 г.

ВОПРОСЫ МЕДИЦИНСКОЙ ХИМИИ



МОСКВА · МЕДИЦИНА · 1986

РЕДАКЦИОННАЯ КОЛЛЕГИЯ:

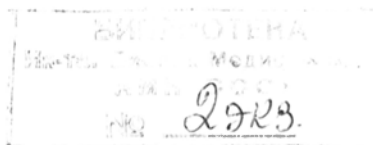
Главный редактор С. С. ДЕБОВ

В. И. МАЗУРОВ (зам. главного редактора), Т. Т. БЕРЕЗОВ, Е. Н. ГЕРАСИМОВА,
В. З. ГОРКИН, И. Б. ЗБАРСКИЙ, А. Н. КЛИМОВ, Б. Ф. КОРОВКИН, Л. А. ЛОК-
ШИНА, В. Н. ОРЕХОВИЧ, Л. Ф. ПАНЧЕНКО, М. Ш. ПРОМЫСЛОВ, Е. Л. РО-
ЗЕНФЕЛЬД, Ю. А. РОМАКОВ (ответственный секретарь), В. А. САКС, С. Е. СЕ-
ВЕРИН, 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)
ТУРАКУЛОВ 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

ACTIVITY OF ENZYMES PARTICIPATING IN METABOLISM OF XENOBIOTICS IN LIVER TISSUE OF RATS DEFICIENT IN VITAMIN A AND IN EXPERIMENTAL T-2 MYCOTOXICOSIS

*A. E. Kranauskas, L. V. Kravchenko,
I. Ya. Kon, V. A. Tutel'yan*

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

Keeping male rats within a month on a ration deficient in vitamin A led to a distinct decrease in content of cytochrome P-450, in activities of carboxylase, epoxide hydrolase, aniline hydrolase and to a slight inhibition of UDP-glucuronosyl transferase in live tissue.

At the same time, activity of glutathione transferase and content of reduced glutathione in liver tissue were increased. After administration of the epoxide-containing T-2 mycotoxin into rats within 10 days at a dose of 0.54 mg/kg activity of the enzymes catalyzing metabolism of xenobiotics was inhibited in the animals maintained on the complete half-synthetic ration, except of epoxide hydrolase and glutathione transferase, activity of which was elevated. The administration of T-2 toxin under conditions of deficiency in vitamin A caused especially distinct inhibition of the enzymes involved in the I phase of xenobiotic metabolism but it was accompanied by only slight increase in T-2 toxicosis. The enzymes participating in conjugation of xenobiotics as well as epoxide hydrolase appear to play major roles in detoxication of T-2 mycotoxin.

МЕТОДЫ БИОХИМИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ

УДК 612.015.3:547.963.1]-08

Н. А. Зорин, О. А. Себелева

БИОСПЕЦИФИЧЕСКИЙ ЭЛЕКТРОФОРЕЗ — НОВЫЙ МЕТОД ИЗУЧЕНИЯ ГЛИКОЗАМИНОГЛИКАНОВ

Центральная научно-исследовательская лаборатория Новокузнецкого института усовершенствования врачей

Изучение гликозаминогликанов (ГАГ) и определение их концентрации в тканях представляют ряд существенных трудностей [1, 5]. Обычно определяют концентрацию одного из компонентов глицидных полисахаридных звеньев [5] или оценивают связывание красителей с фракциями ГАГ, полученными методами зонального электрофореза [2]. Широкие вариации содержания ацетиламиносахаров и гексуроновых кислот в составе различных видов ГАГ, а также возможное разрушение этих компонентов при гидролизе существенно снижают ценность первого из этих методических подходов. Недостатком второго является неодинаковая реактивность красителей с различными видами ГАГ, а также невозможность полного разделения полисахаридов даже при использовании нескольких буферных систем для электрофореза [2]. Поэтому поиск новых методов изучения ГАГ является актуальной проблемой.

Свойство ГАГ образовывать преципитирующие комплексы с определенными соединениями (цетилпиридиния хлоридом, цетилтриметиламмоний бромидом, риванолом и др.) широко используется для выделения их из сложных смесей [5], но лишь недавно оно нашло применение для определения общей концентрации ГАГ в моче [6]. Принцип метода состоит в преципитации ГАГ в агаровом геле, содержащем цетилпиридиния хлорид. При этом между диаметром колец преципитации и концентрацией ГАГ наблюдается логарифмическая зависимость. К сожалению, особенности реакций цетилпиридиния хлорида с различными видами ГАГ остались неизученными, что препятствовало распространению этого метода.

Способность ГАГ образовывать преципитаты в гелевой среде, содержащей соответствующие преципитирующие агенты, послужила основой для разработки нового направления изучения

полисахаридов — биоспецифического электрофореза, сущность которого изложена в данной работе.

Методика

В качестве объекта исследования использовали препараты калиевой соли гиалуроновой кислоты, хондронтин-4-сульфата («Реахим», СССР) и гепарина («Спофа», ЧССР). В качестве преципитиногенов применяли цетилпиридиния хлорид, риванол («Реахим», СССР) и цетилтриметиламмония бромид («Chemapol», ЧССР). Для контроля специфичности реакций преципитации использовали нативную сыворотку крови человека, кристаллический альбумин из сыворотки крови человека и быка («Sigma», США), РНК и ДНК («Serva», ФРГ). В качестве гелеобразующей среды применяли препараты агарозы с различными гелеобразующими и электроэндоосмотическими свойствами (агароза марки А, «Реахим», СССР; агароза тип А, «Pharmacia», Швеция; агароза типа I и IV, «Sigma», США и агароза для электрофореза, «Chemapol», ЧССР), а также агара («Disco», США и «Fergak», ФРГ). Для электрофореза применяли следующие буферные растворы: 0,1 М натрий-фосфатный буфер pH 6,7; 0,02 М веронал-медиановый буфер pH 8,6; 0,1 М растворы ацетата цинка, бария, меди и кальция, а также цитрата натрия [2].

Ракетный биоспецифический электрофорез проводили следующим образом. На стеклянную пластину наносили слой 1 % агара или агарозы в одном из указанных буферов толщиной 1 мм, который содержал определенное количество одного из преципитиногенов. Дальнейшая методика соответствовала таковой при проведении ракетного иммуноэлектрофореза: в геле вырезали лунки, заполняли их исследуемыми препаратами, проводили электрофорез и окрашивали преципитаты [4] 0,1 % раствором ализаринового синего 8GS («Loba Chemie», Австрия) в 3 % уксусной кислоты. Избыток красителя отмывали 3 % уксусной кислотой.

Перекрестный, слитный ракетный, линейный, ракетно-линейный биоспецифический электрофорез выполняли подобно широко известным вариантам количественного иммуноэлектрофореза [4]. Отличия состояли в том, что в реакцию вводились не антигены и антитела, а ГАГ и соответствующие преципитиногены. Аналогичные различия были и между высокочувствительными вариантами биоспецифического электрофореза и иммуноэлектрофореза [3]. Во всех случаях использовали как низковольтный (градиент потенциала 2 В/см), так и высоковольтный (градиент потенциала 10 В/см) варианты биоспецифического электрофореза.

Результаты и обсуждение

При использовании ракетного биоспецифического электрофореза каждый из видов ГАГ образовывал преципитаты определенной формы, а также различной интенсивности окрашивания (рис. 1, см. вклейку). Реакции ГАГ с

цетилпиридиния хлоридом и цетилтриметиламмония бромидом были практически идентичны. В этом случае при равной концентрации ГАГ преципитаты гиалуроната имели наименьшую площадь, тогда как преципитаты гепарина — наибольшую (см. рис. 1). Оптимальное содержание обоих преципитиногенов в геле составляло 0,01 %. При большей их концентрации площадь преципитатов резко уменьшалась, тогда как при меньшей они утрачивали четкость контуров. Оптимальное содержание риванола в геле для биоспецифического электрофореза составляло 0,05 %. В этом случае площади преципитатов гепарина и хондронтин-4-сульфата были практически идентичны, а площадь преципитатов гиалуроната (при равной концентрации всех видов ГАГ) не превышала $\frac{1}{5}$ площади двух других полисахаридов.

В этих условиях чувствительность метода биоспецифического электрофореза соответственно составляла: для гиалуроната — до 100 мкг/мл, а для хондронтин-4-сульфата и гепарина — до 30 мкг/мл. При использовании высокочувствительного ракетного биоспецифического электрофореза, когда в анализ вводили до 0,2 мл раствора ГАГ, чувствительность метода удавалось повысить в среднем в 20 раз, т. е. 5 мкг/мл для гиалуроната и до 1 мкг/мл для гепарина. При многократном определении концентраций ГАГ в идентичных условиях коэффициент вариации результатов не превышал 4 %.

При смешивании препаратов различных ГАГ во всех случаях формировался единый преципитат, площадь которого определялась соотношением ингредиентов. И в этом случае имела линейная зависимость между концентрацией полисахаридов в растворе и площадью их преципитатов.

Оказалось, что свойства гелеобразующего материала имеют важное значение для проведения биоспецифического электрофореза. В геле агара образования преципитатов не наблюдалось. При использовании агарозы со сниженными электроэндоосмотическими свойствами площадь преципитатов ГАГ была существенно больше, чем при употреблении агарозы с выраженными электроэндоосмотическими свойствами. По видимому, это явление связано с наличием в агаре и плохо очищенной агарозе агаропектина — полисахарида,

К ст. Н. А. Зорина и соавт.

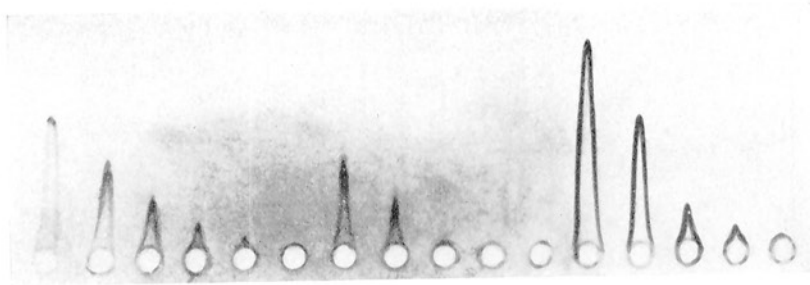


Рис. 1. Биоспецифический ракетный электрофорез ГАГ.

В лунки внесены двукратные разведения (по 4 мкл): следующих ГАГ — хондроитин-4-сульфата (лунки 1—6, 500—15 мкг/мл), гиалуроновой кислоты (лунки 7—11, 500—31 мкг/мл) и гепарина (лунки 12—16, 500—31 мкг/мл). В 1 % агарозный гель внесено 0,01 % цетилтриметиламмония бромида. Электрофорез в течение 16 ч при градиенте потенциала 2 В/см. Анод вверх.

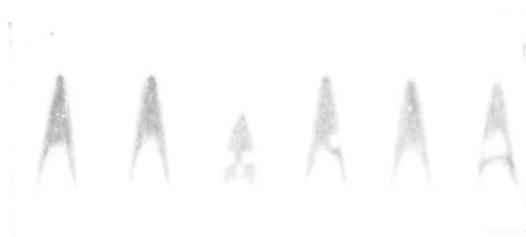
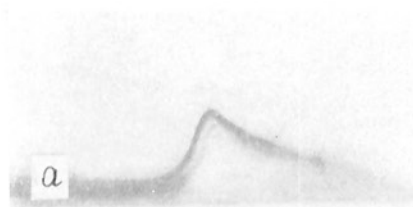
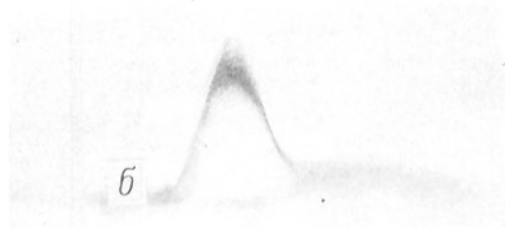


Рис. 2. Влияние нуклеиновых кислот и белков на биоспецифический ракетный электрофорез хондроитин-4-сульфата.

Во все лунки внесено по 2 мкл раствора хондроитин-4-сульфата (500 мкг/мл). В 1-ю лунку добавлено 2 мкл раствора РНК (2 мг/мл), во 2-ю — 2 мкл раствора ДНК (1 мг/мл), а в 3-ю — 2 мкл нативной сыворотки крови. В 3 остальные лунки внесено по 2 мкл 0,02 М веронал-мединазового буфера pH 8,6. В 1 % агарозный гель введено 0,01 % цетилпиридиния хлорида. Анод вверх.



б



в



Рис. 3. Перекрестный биоспецифический электрофорез ГАГ.

А — гиалуроновая кислота, Б — хондроитин-4-сульфат, В — гепарин. В каждом случае анализировали 4 мкл раствора ГАГ (500 мкг/мл). Электрофорез в первом направлении в течение 1 ч при градиенте потенциала 10 В/см, а во втором — в течение 16 ч при градиенте потенциала 2 В/см. В агарозный гель второго направления электрофореза введено 0,01 % цетилтриметиламмония бромида. Анод вверх.

связывающего используемые преципитиногены.

Определенное влияние оказывало и наличие примесей белков и нуклеиновых кислот, которые добавляли к исследуемым препаратам ГАГ. При использовании цетилпиридиния хлорида и цетилтриметиламмония бромиды в оптимальной концентрации для выявления ГАГ белки и нуклеиновые кислоты, анализируемые в тех же условиях, не образовывали преципитатов. В агарозных гелях, содержащих риванол, наблюдалось образование преципитатов ДНК и РНК. При этом площадь преципитатов РНК составляла $\frac{1}{3}$ площади преципитатов сульфатированных ГАГ, а площадь ДНК — $\frac{1}{2}$ площади преципитатов гиалуроновой кислоты. Следует отметить, что четкость преципитатов нуклеиновых кислот значительно ниже, чем у ГАГ. Нуклеиновые кислоты, добавленные к препаратам ГАГ, не изменяли площади преципитатов полисахаридов даже в том случае, когда их содержание превышало концентрацию ГАГ в 2—3 раза (рис. 2, см. вклейку). Это явление наблюдалось при использовании цетилпиридиния хлорида и цетилтриметиламмония бромиды. В случае использования риванола добавление нуклеиновых кислот приводило к уменьшению площади преципитатов ГАГ. Введение в реакцию сыворотки крови или альбумина во всех случаях вызывает уменьшение площади преципитатов ГАГ пропорционально концентрации белка, введенного в реакцию (см. рис. 2).

Скорость формирования преципитатов ГАГ при проведении биоспецифического электрофореза неодинакова. При использовании низковольтного биоспецифического электрофореза преципитаты гапарина образуются через 1,5—2 ч и полностью формируются через 3—4 ч. Для полного формирования преципитатов гиалуроновой кислоты требуется не менее 12—15 ч. Высоковольтный биоспецифический электрофорез позволяет сократить время анализа в $1\frac{1}{2}$ —2 раза, но при его использовании требуется эффективное охлаждение геля.

Преципитаты ГАГ образуются при использовании всех буферных растворов, т. е. при pH 3,5—8,6. Следует отметить, что растворы с высокой ионной силой при длительном проведении электрофореза постепенно загрязняют

электроды продуктами электролиза, что не позволяет рекомендовать их применение для проведения биоспецифического электрофореза. Оптимальными свойствами обладает веронал-медналовый буфер pH 8,6.

Перекрестный биоспецифический электрофорез позволил установить, что каждый из видов ГАГ образует преципитаты определенной формы (рис. 3, см. вклейку). Следует указать, что преципитаты гиалуроната и хондроитин-4-сульфата неоднородны — помимо основной фракции, мигрирующей к аноду, наблюдается образование преципитата, смещенного к катоду. Гепарин в этих условиях образует симметричный гомогенный преципитат (см. рис. 3).

Проведенные исследования также позволили установить, что на основе реакций ГАГ с преципитиногенами можно выполнять различные виды биоспецифического электрофореза, сходные с аналогичными методами количественного иммуноэлектрофореза: линейным, ракетно-линейным, перекрестно-линейным и т. д. Таким образом, нами предлагается новая разновидность электрофоретических методов, основанная на реакциях биоспецифического взаимодействия. Ранее в подобных реакциях использовались взаимодействия пар антиген — антитело [4] или лектин — лиганд [7]. Полученные нами результаты дают основание полагать, что метод биоспецифического электрофореза можно использовать для изучения любых пар биоспецифически реагирующих соединений, если образующийся преципитат не будет мигрировать при проведении электрофореза. Это открывает широкие перспективы для использования биоспецифического электрофореза в различных областях исследования.

Описанные методы биоспецифического электрофореза могут существенно дополнить арсенал современных методов изучения ГАГ. Их достоинствами являются высокая чувствительность, хорошая воспроизводимость и относительная простота. К числу недостатков можно отнести необходимость очистки ГАГ от примесей, а также группоспецифическую реактивность преципитиногенов с различными видами ГАГ. Однако последнее является также и достоинством данных методов, поскольку это свойство позволяет оценивать

общую концентрацию ГАГ в исследуемых образцах, чего невозможно добиться при использовании других методов. В этом случае необходимо предварительно изучить свойства ГАГ в составе исследуемого образца (биологической жидкости или экстракта ткани), чтобы на основе полученных данных подобрать смесь ГАГ, которую можно применять в качестве эталонного препарата.

При изучении отдельных видов ГАГ предлагаемые методы имеют существенные преимущества перед другими методами анализа. Так, эти методы могут быть использованы для исследования реакций ГАГ с другими веществами, которые можно вводить в лунки одновременно с ГАГ или в промежуточные зоны геля, подобно тому, как это делается в методах количественного электрофореза [4]. Особенно важно то, что преципитаты ГАГ при биоспецифическом электрофорезе образуются в широком диапазоне pH. Это может послужить предпосылкой для изучения биоспецифических взаимодействий в оптимальных условиях при минимальной вероятности денатурации исследуемых препаратов.

В заключение следует отметить, что реакции преципитации могут осуществляться не только в гелевой среде. Это открывает перспективы для разработки методов, подобных лазерной иммунофлуоресценции, радиоиммунному и иммуноферментному анализу. Разработ-

ка методов будет способствовать дальнейшему прогрессу в изучении свойств различных биополимеров.

ЛИТЕРАТУРА

1. Бычков С. М., Захарова М. М. — Вopr. мед. химии, 1979, № 3, с. 227—237.
2. Гааль Э., Медьеш Г., Верецкеи Э. Электрофорез в разделении биологических макромолекул. Пер. с англ. М., 1982.
3. Зорин Н. А. — Лаб. дело, 1983, № 10, с. 40—43.
4. Руководство по количественному иммуноэлектрофорезу. Методы и применение / Под ред. Н. Аксельсена и др. Пер. с англ. М., 1977.
5. Слуцкий Л. И. Биохимия нормальной и патологически измененной соединительной ткани. Л., 1969.
6. Dobre V. — Rev. roum. Biochim., 1980, vol. 11, p. 23—26.
7. Owen P., Oppenheim S., Nachbar M. — Analyt. Biochem., 1977, vol. 80, p. 446—457.

Поступила 19.10.84

BIOSPECIFIC ELECTROPHORESIS — A NEW METHOD FOR STUDY OF GLYCOSEAMINOGLYCANS

N. A. Zorin, O. A. Sebeleva

Central Research Laboratory, Medical School, Novokuznetsk

Electrophoretic precipitation of complexes containing glycosaminoglycans and group-specific precipitinogens (cetyl pyridinium chloride, cetyl trimethylammonium bromide, rivanol) is described. Promising applications of the method as well as its dissimilarities as compared with the other types of biospecific electrophoresis (immunoelectrophoresis and affinity electrophoresis involving lectins) are discussed.

ДИСКУССИЯ

УДК 577.1:378.661/(049.2)

Р. А. Юхновец

АКТУАЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ ИНТЕГРАЦИИ ПРЕПОДАВАНИЯ БИООРГАНИЧЕСКОЙ И БИОЛОГИЧЕСКОЙ ХИМИИ В МЕДИЦИНСКИХ ИНСТИТУТАХ

Кафедра биоорганической и биологической химии Полтавского медицинского стоматологического института

Дискуссия, организованная редакцией журнала «Вопросы медицинской химии» по проблеме преподавания биохимии в медицинских институтах, является, несомненно, весьма актуальной. Следствием обобщения ее материалов должны быть централизованные мероприятия,

направленные на улучшение организации учебного процесса. Наряду с вопросами повышения роли биохимии в воспитании специалистов с коммунистическим мировоззрением, оптимизации ее преподавания и некоторыми другими, рассматриваемыми, в статье