

Архив журнала

## Вопросы медицинской химии

*ISSN 0042-8809*

1989 том 35 выпуск 3

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

## Voprosy meditsinskoï khimii

The journal archive

*ISSN 0042-8809*

1989 volume 35 issue 3

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

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

ТОМ 35

ВЫПУСК 3

МАЙ — ИЮНЬ

Двухмесячный научно-теоретический журнал

Основан в 1955 г.

# ВОПРОСЫ МЕДИЦИНСКОЙ ХИМИИ



МОСКВА · МЕДИЦИНА · 1989



## РЕДАКЦИОННАЯ КОЛЛЕГИЯ:

Главный редактор С. С. ДЕБОВ

В. Б. СПИРИЧЕВ (зам. редактора), И. П. АШМАРИН, Т. Т. БЕРЕЗОВ, А. А. ВАСИЛЬЕВ, Е. Н. ГЕРАСИМОВА, В. З. ГОРКИН, И. Б. ЗБАРСКИЙ, В. Л. КОЗЕЛЬЦЕВ (ответственный секретарь), А. И. КЛИМОВ, Б. Ф. КОРОВКИН, Л. А. ЛОКШИНА, В. Н. ОРЕХОВИЧ, Л. Ф. ПАНЧЕНКО, М. Ш. ПРОМЫСЛОВ, Е. Л. РОЗЕНФЕЛЬД, Ю. А. РОМАКОВ, В. А. САКС, С. Е. СЕВЕРИН, В. А. ТУТЕЛЬЯН

## 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)

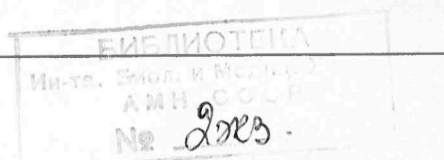
ТУРАКУЛОВ Я. Х. (Ташкент)

ТЯХЕПЫЛД Л. Я. (Тарту)

ШАПОВ В. С. (Москва)

ЯКОВЛЕВ Н. Н. (Ленинград)

ЯСАЙТИС А. А. (Вильнюс)



ну выявило достоверные изменения у больных хроническим алкоголизмом отношений:  $\alpha_1$ -антитрипсин/альбумин ( $p < 0,002$ ); гаптоглобин/альбумин ( $p < 0,02$ );  $\alpha_1$ -антихимотрипсин/ $\alpha_1$ -антитрипсин ( $p < 0,02$ ); гаптоглобин/трансферрин ( $p < 0,05$ ); гемопексин/альбумин ( $p < 0,01$ ) (рис. 3). То, что отношения концентраций представленных на рис. 3 пар белков достоверно повышаются у больных хроническим алкоголизмом, не является неожиданным. Известно, что такие белки, как  $\alpha_1$ -антитрипсин,  $\alpha_1$ -антихимотрипсин и гаптоглобин, относятся к так называемым «позитивным острофазным белкам». С другой стороны, альбумин и трансферрин являются «негативными» белками острой фазы [10]. Несмотря на то что содержание этих белков, взятых в отдельности, достоверно не изменяется (кроме  $\alpha_1$ -антитрипсина) у больных хроническим алкоголизмом, определение отношения концентраций «позитивных острофазных белков» к «негативным» в сыворотке крови может служить одним из биологических маркеров хронического алкоголизма.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Березин В. А. // Укр. биохим. журн. — 1984. — Т. 52, № 1. — С. 227—237.
2. Бэм Э. // Иммунологические методы: Пер. с нем. — М., 1979. — С. 49—55.
3. Вееке Б. // Руководство по количественному иммуноэлектрофорезу: Пер. с англ. — М., 1977. — С. 58—73.
4. Крелль И. // Там же. — С. 103—107.
5. Маурер Г. Диск-электрофорез: Пер. с нем. — М., 1971. — С. 93.
6. Фримель Х. // Иммунологические методы: Пер. с нем. — М., 1987. — С. 108—115.

УДК 616.373.03:[616.127-005.8-036.11-078.73

Л. Г. Рашковецкий, Ф. С. Носков, В. Н. Прозоровский, Б. Ф. Коровкин

### ПОЛУЧЕНИЕ СТАФИЛОКОККОВОГО ИММУНОСОРБЕНТА, СЕНСИБИЛИЗИРОВАННОГО АНТИТЕЛАМИ К М-СУБЪЕДИНИЦАМ ЛДГ

НИИ медицинской энзимологии АМН СССР, Москва, НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Пастера, Ленинград

В настоящее время одним из перспективных направлений в клинической биохимии является создание иммунохимических методов определения изоформ ряда ферментов. Разработка иммунохимических методов позволит значительно увеличить как специфичность, так и чувствительность диагно-

7. Чернобровкина Т. В., Кершенгольц Б. М., Алексеев В. Г. и др. // Лаб. дело. — 1986. — № 9. — С. 523—525.
8. Чуркин Е. А. // Журн. невропатол. и психиатр. — 1967. — № 2. — С. 280—283.
9. Ширгель Б. // Иммунологические методы: Пер. с нем. — М., 1979. — С. 24—29.
10. Kushner J. // Ann. N. Y. Acad. Sci. — 1982. — Vol. 389. — P. 39—48.
11. Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., Randall R. J. // J. biol. Chem. — 1951. — Vol. 193. — P. 265—275.
12. Poupon R. E. // Gastroent. Clin. Biol. — 1987. — Vol. 11, N 5. — P. 412—417.
13. Wands J. R. // Biochemistry and Pharmacology of Ethanol. — New York, 1979. — Vol. 1. — P. 641—658.

Поступила 21.04.88

### ANALYSIS OF PROTEINS IN BLOOD SERUM OF PATIENTS WITH CHRONIC ALCOHOLISM USING CROSS IMMUNOELECTROPHORESIS

N. V. Tributsina, A. A. Mikhnev, V. A. Berezin, O. E. Efimov, L. I. Privalova

State University, Psychoneurological Hospital, Dnepropetrovsk, Institute for Postgraduate Training of Physicians, Zaporozhje

Prealbumin, albumin,  $\alpha_1$ -antitrypsin,  $\alpha_1$ -antichymotrypsin, ceruloplasmin, haptoglobin, transferrin, IgG, IgM and IgA were studied in blood serum of healthy donors and of patients with chronic alcoholism by means of cross immunoelectrophoresis and immunodiffusion. Only content of  $\alpha_1$ -antitrypsin was distinctly altered in blood serum of the patients with alcoholism as compared with normal state, while individual variations in content of the proteins studied were considerably higher in blood serum of the patients. At the same time, distinct dissimilarity of the patterns studied was found between healthy donors and patients with chronic alcoholism when concentration ratios of some positively and negatively charged acute phase proteins were calculated ( $\alpha_1$ -antitrypsin/albumin, haptoglobin/albumin, haptoglobin/transferrin).

стических тестов по сравнению с существующими.

Разработанный ранее иммунохимический способ определения изофермента ЛДГ-1, важного для диагностики острого инфаркта миокарда [6, 8], хорошо зарекомендовал себя на практике [5, 7—9] в сравнении с тради-

ционным электрофоретическим методом определения изоферментов ЛДГ. Однако широкое применение данного метода ограничивается использованием антител к антигену человека или обезьяны.

Целью настоящей работы являлась разработка иммуносорбента для разделения изоформ ЛДГ, полученного на основе доступных биологических материалов, который мог бы найти широкое применение в клинико-диагностической практике.

### Методика

*Очистка моноспецифических антител к М-субъединицам ЛДГ.* Выделение антител из кроличьей сыворотки к М-субъединицам ЛДГ свиньи проводили с помощью антигенного иммуносорбента, который получали, сшивая молекулы ЛДГ глутаровым альдегидом. Для приготовления антигенного иммуносорбента 5 г ЛДГ из скелетных мышц свиньи ("Reanal", ВНР) растворяли в 67 мл 0,1 М фосфатного буфера pH 7,0. При интенсивном перемешивании быстро добавляли 20 мл 2,5 % раствора глутарового альдегида. Образующийся после выдерживания в течение 3 ч при комнатной температуре гель измельчали в ступке и многократно промывали 0,2 М фосфатным буфером, pH 7,3. Затем такую же промывку проводили буфером для элюции антител (0,2 М глицин-солянокислый буфер pH 2,8) и окончательно антигенный иммуносорбент уравнивали стартовым буфером для посадки антител — 0,01 М фосфатным буфером, pH 7,0 с добавлением 0,15 М солянокислого натрия.

К влажному осадку антигенного иммуносорбента добавляли 100 мл антисыворотки и инкубировали при комнатной температуре на качалке в течение 2 ч. После многократной отмывки антигенного иммуносорбента фосфатно-солевым буфером сорбировавшиеся антитела элюировали, добавляя к гелю 40 мл 0,2 М глицин-солянокислого буфера pH 2,8. После 3-кратной элюции элюаты объединяли, фильтровали и лиофилизировали.

Моноспецифические антитела к М-субъединицам ЛДГ также выделяли из антисыворотки на сорбенте, полученном иммобилизацией ЛДГ из скелетных мышц свиньи ("Reanal", ВНР) на BrCN-агарозе (производство Института химии АН Эстонской ССР) по стандартной методике (8 мг белка на 1 г носителя) [2].

Все стадии процесса очистки моноспецифических антител контролировали с помощью метода двойной радиальной иммунодиффузии.

*Получение стафилококкового иммуносорбента.* Выпускаемый Ленинградским НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Пастера препарат убитых клеток *Staphylococcus aureus*, содержащих белок А, трижды отмывали 20-кратным объемом 0,05 М натрий-фосфатного буфера pH 7,4, содержащего 0,10 М солянокислый натрий (фосфатно-солевой буфер). Затем к бактериальным клеткам добавляли взятый в избытке раствор моноспецифических антител кролика к М-субъединицам ЛДГ свиньи в фосфатно-солевом буфере. Специфическую сорбцию иммуноглобулинов G на белке А, кова-

лентно связанном с элементами бактериальной клеточной стенки, проводили до полного насыщения связывающей способности клеток стафилококка. Протекание процесса сорбции контролировали, определяя содержание антител в надосадке с помощью метода двойной радиальной иммунодиффузии. Полученный стафилококковый иммуносорбент отмывали от несвязавшихся антител 20-кратным объемом фосфатно-солевого буфера. Отмывку повторяли 3 раза.

Электрофоретическое разделение изоферментов ЛДГ проводили на ацетат-целлюлозных мембранах и в агарозе. Проявление электрофоретических ферментных активностей ЛДГ проводили по стандартной методике [1].

Ферментную активность ЛДГ определяли колориметрически (набор реактивов "Lachema", ЧССР) и спектрофотометрически (набор реактивов LDH Monotest фирмы "Boehringer Mannheim", ФРГ).

### Результаты и обсуждение

В проведенных исследованиях мы основывались на данных литературы, что однотипные субъединицы ЛДГ у разных видов животных структурно более схожи, чем субъединицы разных типов у особей одного вида [3]. Отсюда вытекают два важных следствия, положенных в основу всей работы: во-первых, антитела, полученные к одному типу субъединиц, не дают перекрестных реакций с субъединицами другого типа, и, во-вторых, открывается возможность использования гетерологической антисыворотки, т. е. в нашем случае антисыворотки к свиному антигену, с которой реагируют соответствующие антигены сыворотки крови человека. Как было нами ранее показано, антитела к М-субъединицам ЛДГ свиньи взаимодействуют только с содержащими М-субъединицы изоформами ЛДГ человека.

Определение диагностически значимого изофермента ЛДГ-1, основанное на отделении этого изофермента от остальных изоформ ЛДГ с помощью специфических антител, связано с необходимостью использования эффективного и практичного способа разделения образующихся иммунных комплексов и свободного изофермента ЛДГ-1. Был разработан иммуносорбент, позволяющий отделить изофермент ЛДГ-1 от других изоформ ЛДГ. Иммуносорбент представляет собой убитые клетки *Staphylococcus aureus*, содержащие в своей клеточной стенке белок А, с сорбированными на нем антителами к М-субъединицам ЛДГ свиньи.

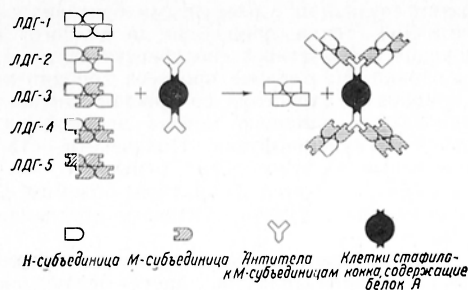


Рис. 1. Принципиальная схема иммунохимического метода определения изофермента ЛДГ-1.

Твердофазную основу со связанными антителами использовали в связи с тем, что сродством гетерологических антител к соответствующим белкам человека оказалось невысоким, так как имеет место только частичная иммунологическая идентичность М-субъединиц ЛДГ человека и свиньи [4]; для полного связывания удаляемых изоформ к пробе требуется добавить большой избыток цельной антисыворотки, что должно снижать чувствительность определения вследствие разведения анализируемых сывороток. Концентрирование же антител на клетках стафилококка позволяет решить задачу полного и быстрого осаждения образующихся иммунных комплексов без разбавления тестируемых проб.

Обработка стафилококковым иммуносорбентом сыворотки крови челове-

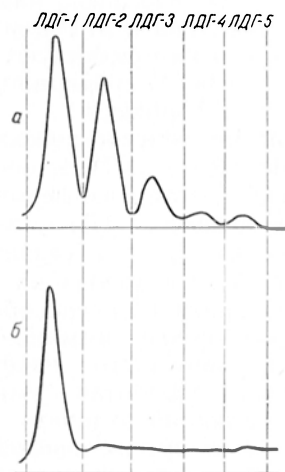


Рис. 2. Денситограммы электрофоретического разделения изоферментов ЛДГ интактной сыворотки крови больного острым инфарктом миокарда (а) и той же сыворотки, обработанной стафилококковым иммуносорбентом (б).

ка приводит к полному связыванию с ним всех изоферментов ЛДГ, в состав которых входят М-субъединицы. Изоформа ЛДГ-1, содержащая только Н-субъединицы, с иммуносорбентом не связывается. Принцип разработанного иммунохимического способа определения ЛДГ-1 представлен на рис. 1.

В результате обработки клеток стафилококка цельной кроличьей антисывороткой к ЛДГ-5 (М-субъединицам) свиньи был получен иммуносорбент с невысокой сорбционной емкостью по отношению к антигену, поскольку с клетками стафилококка, помимо антител требуемой специфичности, связывались все другие обычно присутствующие в сыворотке иммуноглобулины, обладающие сродством к белку А. Использование такого иммуносорбента не давало полного удаления всех изоферментов ЛДГ, содержащих М-субъединицы, из тестируемых сывороток крови человека. Поэтому, для того чтобы повысить ЛДГ-связывающую способность иммуносорбента, клетки стафилококка обрабатывали очищенными моноспецифическими антителами, выделенными с помощью аффинной хроматографии. Стафилококковый иммуносорбент, сенсибилизированный очищенными моноспецифическими антителами к М-субъединицам ЛДГ свиньи, полностью связывал 2,3,4 и 5-й изоферменты ЛДГ в обрабатываемой сыворотке крови человека, что подтверждалось результатами электрофоретического разделения изоферментов ЛДГ в сравнении с определением ферментативной активности ЛДГ в сыворотках до и после их обработки иммуносорбентом (рис. 2).

Схему определения активности ЛДГ-1 в сыворотке крови можно представить в виде следующих последовательных операций: 1) добавление тестируемой сыворотки (60 мкл) в микропробирку со стафилококковым иммуносорбентом (50 мг); 2) тщательное перемешивание и инкубация при комнатной температуре (5 мин); 3) центрифугирование (3000 g, 10 мин); 4) отбор надосадка для измерения активности ЛДГ или электрофоретического анализа. Измерение ферментной активности ЛДГ в интактных и обработанных иммуносорбентом сыворотках можно проводить любым до-

ступным методом — как колориметрическим, так и спектрофотометрическим.

Таким образом, разработан быстрый, простой в техническом исполнении иммунохимический способ определения активности изофермента ЛДГ-1, который может найти широкое применение в клинко-диагностической практике.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Иванов И. И., Коровкин Б. Ф., Маркелов И. М. Введение в клиническую энзимологию. — Л., 1974.
2. Остерман Л. А. Исследование биологических макромолекул электрофокусированием иммуноэлектрофорезом и радиоизотопными методами. — М., 1983.
3. Burd J. F., Usategui-Gomez M. // Biochim. biophys. Acta. — 1973. — Vol. 310, N 1. — P. 238—247.
4. Gruber W., Zapf B., Schrappe K.-H., Linke R. // Z. klin. Chem. klin. Biochem. — 1977. — Bd 15, N 10. — S. 575—577.

5. Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., Randall R. J. // J. biol. Chem. — 1951. — Vol. 193. — P. 265—275.
6. Schmidt N. F., Brush A. H. // Analyt. Biochem. — 1970. — Vol. 38, N 1. — P. 158—163.

Поступила 12.11.87

#### PRODUCTION OF STAPHYLOCOCCAL IMMUNOSORBENT SENSITIZED BY ANTIBODIES TOWARDS M-SUBUNITS OF LACTATE DEHYDROGENASE

L. G. Rashkovetsky, F. S. Noskov, V. N. Prozorovsky, B. F. Korovkin

Institute of Medical Enzymology, Academy of Medical Sciences of the USSR, Moscow, L. Pasteur Institute of Epidemiology and Microbiology, Leningrad

A simple and rapid immunochemical procedure is developed for estimation of the LDH<sub>1</sub> activity which involved separation of LDH<sub>1</sub> from other LDH isoenzymes using immunosorbent. The immunosorbent consisted of killed *Staphylococcus aureus* cells, membrane of which contained protein A with absorbed antibodies towards M-subunits of porcine LDH.

## МЕТОДЫ БИОЛОГИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ

УДК 616-008.93:577.117.3]-02-074:543.426.

Л. П. Коржова, Е. В. Фролова, Ю. А. Ромаков

### СПЕКТРОФЛЮОРИМЕТРИЧЕСКИЙ МЕТОД РЕГИСТРАЦИИ ПРОДУКТОВ ОКИСЛИТЕЛЬНОЙ ДЕСТРУКЦИИ ЭУМЕЛАНИНОВ

Научно-исследовательская лаборатория биологических структур Минздрава СССР

Как известно, эумеланины, обуславливающие цвет черных волос и кожи, представляют собой практически нерастворимые гетерополимеры, устойчивые к разного рода физико-химическим воздействиям. В то же время сильные окислители типа перекиси водорода ( $H_2O_2$ ) вызывают посветление волос и пигментированных тканей в результате окислительной деструкции эумеланинов [3]. Однако продукты перекисной деструкции пигментов изучены недостаточно, имеются лишь единичные работы в этом направлении, причем с использованием очень жестких условий воздействия  $H_2O_2$  [1, 8]. В мягких условиях, при малой концентрации,  $H_2O_2$  не вызывала достоверного посветления пигмента за 30 мин инкубации при 100°C, но при

этом пигмент переходил в растворимое состояние и приобретал способность к флуоресценции [7]. Какие-либо другие характеристики меланина в данной работе не исследовали, тем не менее по интенсивности этой  $H_2O_2$ -индуцированной флуоресценции авторы предлагают оценивать количество меланина в тканях, не учитывая возможность деструкции пигмента даже при таком относительно мягком воздействии. Следует подчеркнуть, что состояние меланина в процессе окислительной деструкции, особенно на начальных этапах, практически не исследовалось, хотя такие данные представляли бы определенный интерес как с практической, так и с теоретической точки зрения. Это и явилось задачей данной работы.