

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

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. Н. 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)

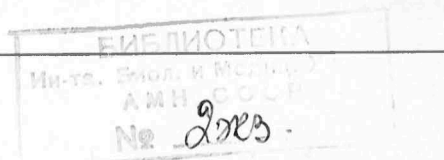
ТУРАКУЛОВ Я. Х. (Ташкент)

ТЯХЕПЫЛД Л. Я. (Тарту)

ШАПОВ В. С. (Москва)

ЯКОВЛЕВ Н. Н. (Ленинград)

ЯСАЙТИС А. А. (Вильнюс)



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 клинико-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. Rashkovelsky, 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<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) 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<sub>2</sub>O<sub>2</sub> [1, 8]. В мягких условиях, при малой концентрации, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> не вызвала достоверного посветления пигмента за 30 мин инкубации при 100 °С, но при

этом пигмент переходил в растворимое состояние и приобретал способность к флюоресценции [7]. Какие-либо другие характеристики меланина в данной работе не исследовали, тем не менее по интенсивности этой H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-индуцированной флюоресценции 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.

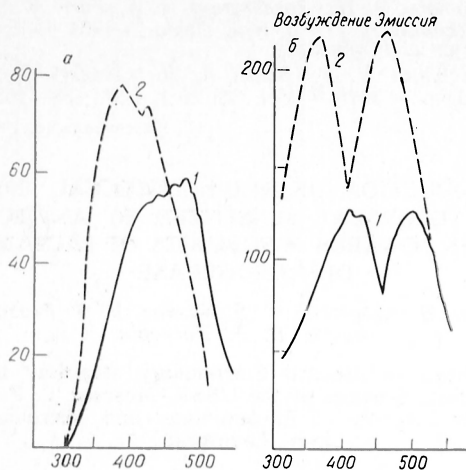


Рис. 1. Спектры флюоресценции суммарной пробы ДОФА-меланина сразу после добавления  $H_2O_2$  (1) и через 60 мин (2).

*a* — одновременное сканирование длин волн возбуждения и эмиссии,  $\Delta\lambda 70$  нм; *b* — спектры возбуждения ( $\lambda_{эмисс} = 440$  нм) и эмиссии ( $\lambda_{возб} = 350$  нм). По оси абсцисс — длина волны, нм; по оси ординат — интенсивность флюоресценции, усл. ед.

### Методика

Водорастворимый ДОФА-меланин получали путем окисления DL-диоксифенилаланина («Серва», ФРГ) кислородом воздуха по методу [4], меланопротенины экстрагировали из черных волос 2,5 н. NaOH по методу [2]. Люофилизированные препараты пигментов (по 30 мг) инкубировали в 5 мл 0,05 М  $Na_2CO_3$ , содержащем  $H_2O_2$  в конечной концентрации 3% в течение 60 мин при 100 °С. Состояние пигмента в процессе реакции (сразу после добавления  $H_2O_2$ , через 10, 20, 30 и 60 мин инкубации) оценивали по поглощению при 400 нм, по спектрам флюоресценции и молекулярной массе. В случае меланопротенинов анализировали соединения, перешедшие в раствор. УФ-спектры снимали на спектрофотометре SP-800 фирмы «Юникам», спектры флюоресценции — на спектрофлюориметре RF-540 фирмы «Шимадзу» при ширине щели 5 нм, гель-хромато-

графию проводили на колонках 900×25 мм, используя тоеперл-55 и тоеперл-40, элюция 1,55 М  $NH_4OH$  со скоростью 2,5 мл/мин/см<sup>2</sup>, объем фракций 5 мл. Расчеты вели на 1 мг сухой массы.

### Результаты и обсуждение

Сразу после добавления  $H_2O_2$  ДОФА-меланин приобретал способность к флюоресценции в области 500—510 нм (рис. 1), что соответствует данным литературы [7]. В исходном пигменте флюоресценция не выявлялась. При гель-хроматографии этих проб показано, что флюоресцирующие соединения неоднородны:  $H_2O_2$ -индуцированная флюоресценция обнаруживалась и в высокомолекулярной фракции ДОФА-меланина (максимум эмиссии 500 нм), элюировавшейся во внешнем объеме колонки, и в окрашенных соединениях с меньшей молекулярной массой (максимум эмиссии 430 нм) (рис. 2). Следует отметить, что на этом этапе профили элюции (по поглощению при 400 нм) исходного ДОФА-меланина и опытной пробы были близки: около 70% окрашенных соединений (по сухой массе) элюировалось во внешнем объеме колонки (мол. масса > 700 000), часть — во внутреннем объеме колонки, но в отличие от опытной пробы в исходном пигменте и ни в одной из его фракций флюоресценция не обнаруживалась.

В процессе инкубации ДОФА-меланина с  $H_2O_2$  наблюдалось постепенное посветление пигмента, сопровождающееся увеличением интенсивности флюоресценции и смещением ее в область 490—470 нм. При гель-хрома-

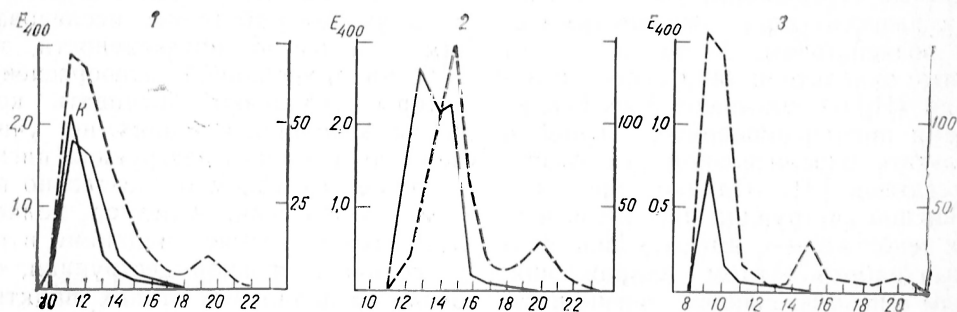


Рис. 2. Гель-хроматография ДОФА-меланина.

K — исходный ДОФА-меланин, тоеперл-55; 1 — ДОФА-меланин сразу после добавления  $H_2O_2$ , тоеперл-55, 2 — через 60 мин инкубации, тоеперл-55, 3 — то же, но с использованием тоеперл-40. Сплошная линия — оптическая плотность, пунктирная — флюоресценция, усл. ед. По оси абсцисс — номера фракций.

тографии опытных проб (через 20 и 30 мин инкубации) отмечалось возрастание доли слабо окрашенных флуоресцирующих продуктов (с максимумом флуоресценции при 430—440 нм), элюировавшихся во внутреннем объеме колонки, и соответственно уменьшение количества высокомолекулярных соединений.

Через 60 мин инкубации пигмент обесцветился более чем в 5 раз, интенсивность флуоресценции возросла в 2 раза, причем при одновременном сканировании в суммарной пробе выявлялось два максимума эмиссии при 440 и 470 нм (см. рис. 1). На колонке с тоеперл-55 окрашенные соединения элюировались одним пиком, но не во внешнем, как в случае исходного ДОФА-меланина, а в начальном объеме колонки, что свидетельствует о снижении молекулярной массы этой фракции. Профиль элюции, регистрируемый спектрофлуориметрически, существенно отличался от такового при спектрометрическом анализе: во внутреннем объеме колонки элюировались две фракции флуоресцирующих продуктов (см. рис. 2). Эти функции объединяли и фракционировали на колонках с тоеперл-40, получая при этом три фракции флуоресцирующих соединений: слабо окрашенную промежуточную, элюировавшуюся во внешнем объеме колонки, и две практически бесцветные низкомолекулярные. Полученные фракции очищали рехроматографией (высокомолекулярную фракцию — на колонках с тоеперл-55, промежуточную и низкомолекулярные фракции — на колонках с тоеперл-40), лиофилизировали и снимали их спектральные характеристики.

По сухой массе более 50% ДОФА-меланина, обесцвеченного  $H_2O_2$  было представлено слабо окрашенными промежуточными соединениями с мол. массой более 10 000 (2-я фракция). Количество высокомолекулярной фракции, составившей более 70% исходного пигмента, уменьшилось почти в 3 раза. Снизилась и молекулярная масса этой фракции ( $<700\ 000$ ), а также удельная оптическая плотность при длине волны 400 нм (с 18,5 о. е/мг в исходном ДОФА-меланине до 3,4 о. е/мг в обесцвеченном). Обе эти фракции обладали способностью к флуоресценции: высокомолекулярные соединения флуоресцировали в обла-

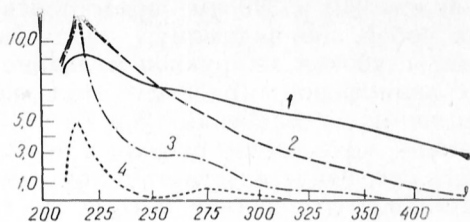


Рис. 3. Скорректированные УФ-спектры продуктов окисления ДОФА-меланина.

1 — высокомолекулярная фракция; 2 — промежуточная фракция; 3 — низкомолекулярная фракция (~1000); 4 — низкомолекулярная фракция (~300).

сти 470 нм (60 усл. ед/мг), промежуточные — в области 430 нм, причем интенсивность их флуоресценции была значительно выше (222 усл. ед/мг). Около 20% по сухой массе составляли практически бесцветные соединения 3-й фракции (мол. масса ~1000), выявляемые только спектрофлуориметрически. В спектре их поглощения в отличие от монотонного спектра соединений 1-й и 2-й фракций присутствовала широкая полоса в области длины волны 250—270 нм (рис. 3), флуоресценция смещена в коротковолновую область (410 нм, 25 усл. ед/мг). На выходе с колонки обнаруживались следовые количества слабо флуоресцирующих бесцветных соединений 4-й фракции с мол. массой ~300, содержащих два типа флуоро-

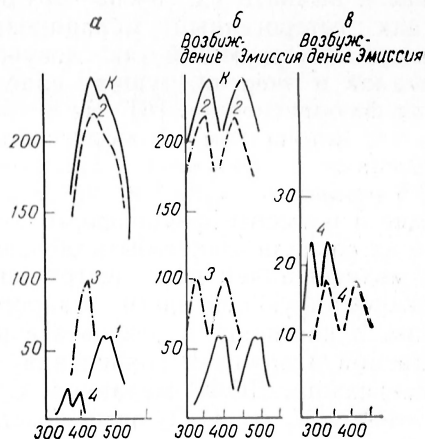


Рис. 4. Скорректированные спектры флуоресценции продуктов окисленного ДОФА-меланина.

K — суммарный ДОФА-меланин через 60 мин инкубации с  $H_2O_2$ ; 1—4 — то же, что на рис. 3. а — одновременное сканирование длин волн возбуждения и эмиссии,  $\Delta 70$  нм; б, в — спектры возбуждения и эмиссии, снятые в оптимальных условиях. По оси ординат — удельная флуоресценция, усл. ед. на 1 мг сухой массы фракции.

форов: с максимумом эмиссии при длине волны 410 и 340 нм, представлявших собой, по-видимому, продукты более глубокой деструкции меланиновых хромофоров (рис. 4). Наличие бесцветных соединений 3-й и 4-й фракций, качественно отличных от окрашенных, свидетельствует о том, что длительное воздействие  $H_2O_2$  в жестких условиях может приводить к деструкции основных субъединиц пигмента. Однако даже на этом этапе глубокого окисления более 70 % по сухой массе составляли окрашенные соединения 1-й и 2-й фракций, флюоресцирующие в области длин волн 470 и 430 нм соответственно. По характеру флюоресценции эти две фракции окрашенных продуктов окисления ДОФА-меланина близки к флуорофорам, обнаруженным буквально в последние годы в эумеланинах и в том числе в ДОФА-меланине [5, 6]: используя высокочувствительный спектрофлюориметр удалось показать наличие в этих пигментах двух типов флуорофоров с максимумом эмиссии при 430—440 и 470—490 нм (ширина щели 10 нм). Структура этих флуорофоров неизвестна, но, по мнению авторов [6], теоретически источником флюоресценции могут быть 5,6-дигидроксииндолы, модифицированные при последующей полимеризации. В меланинах эти флуорофоры связаны с нефлюоресцирующей частью макромолекулы и выявить их очень трудно, так как гетерогенный меланиновый полимер, действующий как ловушка радикалов и энергии, тушит слабый сигнал флюоресценции [6]. Не исключено, что источником флюоресценции окрашенных продуктов окисления ДОФА-меланина являются предшествующие в пигменте флуорофоры. Усиление их сигнала может быть обусловлено модификацией или деструкцией нефлюоресцирующей части макромолекулы, в частности в результате наблюдаемой в процессе окисления деполимеризации ДОФА-меланина. Следует отметить, что  $H_2O_2$  очень быстро инициирует процесс деполимеризации, поскольку непосредственно после добавления  $H_2O_2$  наряду с высокомолекулярной фракцией обнаруживались, хотя и в небольших количествах, флюоресцирующие соединения с меньшей молекулярной массой.

Воздействие  $H_2O_2$  на нерастворимые

меланопротенины приводит к их постепенному переходу в раствор и осветлению, что сопровождалось появлением и накоплением флюоресцирующих соединений, аналогичных продуктам деструкции ДОФА-меланина.

На основании полученных данных можно предполагать, что окисление меланинов начинается с их деполимеризации. Специфические меланиновые хромофоры (индолхиноны) при этом изменяются, по всей вероятности, незначительно; по крайней мере спектры поглощения окрашенных продуктов (высокомолекулярных и промежуточных) в УФ- и ИК-области практически не отличались от исходного. Параметры их флюоресценции также близки к предшествующим в меланинах флуорофорам. Образование в процессе реакции низкомолекулярных бесцветных соединений, качественно отличных от окрашенных, свидетельствует о более глубоком окислении меланиновых субъединиц, приводящем в конечном итоге к деструкции основных меланиновых хромофоров. Продукты окислительной деструкции как ДОФА-меланина, так и естественных эумеланинов обладали способностью к флюоресценции. Начальные стадии процесса характеризовались появлением длинноволновой флюоресценции (500—510 нм) без изменения спектра поглощения. Дальнейшая деполимеризация сопровождалась увеличением интенсивности флюоресценции и смещением ее в область 430—440 нм, окисление основных меланиновых хромофоров — образованием низкомолекулярных бесцветных соединений, флюоресцирующих в области 410 нм и на следующем этапе деструкции в области 340 нм. Таким образом, с помощью спектрофлюориметрического метода в сочетании с гель-хроматографией можно в определенной мере судить о степени и глубине окислительной деструкции эумеланинов.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Binns F., Chapman R. F., Robson N. C. et al. // J. chem. Soc. Sec. C. — 1970. — P. 1128—1133.
2. Bolt A. G. // Life Sci. — 1967. — Vol. 6. — P. 1277—1291.
3. Erlemann G. A., Beyer H. // J. Soc. Cosmet. Chem. — 1972. — Vol. 23. — P. 791—802.
4. Felix C. C., Hyde J. C., Sarna T., Sealby R. S. // J. Amer. chem. Soc. — 1978. — Vol. 100. — P. 3922—3926.

5. *Gallas J. E.* // JEEE J. Quant. Electron. — 1984. — Vol. QE-20. — P. 1379—1382.
6. *Gallas J. E., Fisner M. J.* // Photochem. Photobiol. — 1987. — Vol. 45. — P. 595—600.
7. *Rosenthal M. H., Kreider J. W., Shiman R. I.* // Analyt. Biochem. — 1973. — Vol. 56. — P. 91—99.
8. *Swan G. A., Wagott A.* // J. chem. Soc. Sec. C. — 1970. — P. 1409—1418.

Поступила 04.05.88

#### SPECTROFLUORIMETRIC PROCEDURE FOR REGISTRATION OF PRODUCTS DEVELOPED AFTER OXIDATIVE DESTRUCTION OF EUMELANINS

*L. P. Korzhova, E. V. Frolova, Yu. A. Romakov*

Dynamics of oxidative destruction of DOPA-melanin and melanin proteins was studied after treatment with 3% hydrogen peroxide within 60 min at 100°. The pigments were estimated by absorption at 400 nm as well as by

means of spectrofluorimetric patterns both in total preparation and in preparation obtained after fractionation on Tojapearl-55 and Tojapearl-40. Intensive fluorescence in the region 500-510 nm was detected within initial steps of oxidation while the absorption spectrum was unaltered. These fluorescent substances were heterogenous: fluorescence was detected both in main high molecular fraction and in low molecular substances (fluorescence was absent in the initial melanin and its fractions). During incubation gradual decolorization of the pigment was observed. This process was related to depolymerization and to an increase in content of slightly coloured low molecular substances exhibiting maximal fluorescence at 430 nm. The further steps of oxidation, affecting main subunits of melanin (indol quinones), involved formation of low molecular, practically discoloured substances with fluorescence at 340 nm and 410 nm. The spectrofluorimetric procedure combined with gel chromatography may be used in evaluation of the rate and degree of eumelanins oxidative destruction.

#### СОДЕРЖАНИЕ

- Айдарханов Б. Б., Локишина Э. А., Ленская Е. Г.* Молекулярные аспекты механизма антиокислительной активности витамина Е: особенности действия α- и γ-токоферолов . . . . . 2
- Образцов В. В., Гришанова А. Ю., Мишин В. М.* Индукция микросомной монооксигеназы полностью фторированными органическими соединениями (Обзор) . . . . . 9
- Ланкин В. З., Вихерт А. М., Тихазе А. К., Согоян С. М., Бондарь Т. Н.* Роль перекисного окисления липидов в этиологии и патогенезе атеросклероза (Обзор) . . . . . 18
- Кальнова Н. Ю.* Влияние радиотерапии на антиокислительную активность тканей и эритроцитов крови . . . . . 25
- Косникова И. В.* Активность пентозофосфатного пути метаболизма глюкозы в ишемизированных скелетных мышцах человека и животных . . . . . 28
- Крылов Ю. Ф., Кононенко Т. Л., Смирнов П. А., Тигралян Р. А., Калига Н. Ф., Мелконян А. Г.* Изменение углеводного обмена, секреции инсулина и глюкагона у нормогликемических крыс при введении различных доз никотинамида . . . . . 30
- Мельник Е. И., Циренина М. Л., Ушаков А. Н., Колтовая Н. А., Боброва О. В., Крехнов Б. В., Смольникова Н. М., Островская Р. У.* Некоторые биохимические показатели у крыс при антенатальной алкоголизации . . . . . 33
- Медведева Н. В., Морозкин А. Д., Горошкова И. Н., Рууге Э. К., Щербаклова И. А., Перови Н. В., Лякишев А. А.* Распределение липопротеинов низкой плотности по флотационным характеристикам в норме и при дислипидемиях . . . . . 36
- Касимова Г. М., Мирталипов Д. Т., Абидов А. А., Акбаров З. С.* Липиды эритроцитов при сахарном диабете с сосудистыми поражениями . . . . . 42

#### CONTENTS

- Aydarkhanov, B. B., Lokshina, E. A., Lenskaya, E. G.* Molecular aspects of the vitamin E antioxidative activity: specific reactions of α-and γ-tocopherols . . . . . 2
- Obraztsov, V. V., Grishanova, A. Yu., Mishin, V. M.* Induction of microsomal monooxygenase by fluorated organic compounds (a review) . . . . . 9
- Lankin, V. Z., Vihert, A. M., Tikhaze, A. K., Sogoyan, S. M., Bondar, M. N.* The role of lipid peroxidation on etiology and pathogenesis of atherosclerosis (a review) . . . . . 18
- Kal'nova, N. Yu.* Antioxidative activity as an index of an oncological disease severity. Effect of radiotherapy on the antioxidative activity in tissues and blood cells . . . . . 25
- Kosnikova, I. V.* Activity of the pentosephosphate shunt in ischemized human and animal skeletal muscles . . . . . 28
- Krylov, Yu. F., Kononenko, T. L., Smirnov, P. A., Tigranyan, R. A., Kalita, N. F., Melkonyan, A. G.* Alterations in carbohydrate metabolism, secretion of insulin and glucagon in normoglycemic rats treated with various doses of nicotinamide . . . . . 30
- Mel'nik, E. I., Tsirenina, M. L., Ushakov, A. N., Koltovaya, N. A., Bobrova, O. V., Krachnov, B. N., Smol'nikova, N. M., Ostrovskaya, R. U.* The alcohol syndrome in fetus. Some biochemical patterns . . . . . 33
- Medvedeva, N. V., Morozkin, A. D., Gorshkova, I. N., Ruuge, E. K., Scherbakova, I. A., Perova, N. V., Lyakishev, A. A.* Flotation patterns of LDL particles in normal state and in dislipoproteinemias . . . . . 36
- Kasimova, G. M., Mirtalipov, D. T., Abidov, A. A., Akbarov, Z. S.* Lipids from erythrocytes of patients with diabetes mellitus and diabetic angiopathies . . . . . 42