

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)

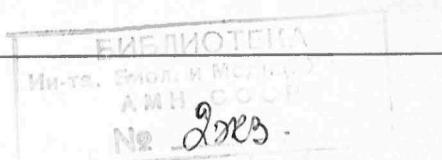
ТУРАКУЛОВ Я. Х. (Ташкент)

ТЯХЕПЫЛД Л. Я. (Тарту)

ШАПОВ В. С. (Москва)

ЯКОВЛЕВ Н. Н. (Ленинград)

ЯСАЙТИС А. А. (Вильнюс)



5. Maslow W. C., Muensch H. A., Azama F., Scheider S. // Clin. Chem. — 1983. — Vol. 29. — P. 260—263.
6. Nouwen E. J., Pollet D. E., Eerdeken M. W. et al. // Cancer Res. — 1986. — Vol. 46. — P. 866—876.
7. Nouwen E. J., Pollet D. E., Eerdeken M. W. et al. // Ibid. — 1985. — Vol. 45. — P. 892—902.
8. Pollet D. E., Nouwen E. J., Schelstraete J. B. et al. // Clin. Chem. — 1985. — Vol. 31. — P. 41—45.

Поступила 27.11.87

PLACENTAL ALKALINE PHOSPHATASE AS A MARKER OF MALIGNANT NEOPLASMS

L. P. Pashintseva, S. O. Gudima, E. A. Kozyreva, A. V. Voronov, A. A. Mierinya, L. S. Basalyk, Yu. Yu. Vengerov, I. I. Votrin

All-Union Oncological Research Centre, Institute of Medical Enzymology, Academy of Medical Sciences of the USSR, Institute of Applied Molecular Biology, Ministry of Public Health of the USSR, Moscow

Activity of placental alkaline phosphatase (PAP) was studied in blood serum of 53 healthy persons and of 72 oncologic patients, using solid-phase immunoenzymatic analysis with polyclonal antibodies towards PAP. The enzyme was detected both in blood serum of healthy persons and of oncologic patients. The blood serum under study was preheated at 65° in order to inactivate the intestinal phosphatase — the only isoenzyme cross-reacting with antibodies to thermostable PAP. This controlled heating treatment decreased distinctly the possibility of pseudopositive reactions. The limiting values of the PAP activity were about 0.15 un/L in blood sera of healthy persons. Higher values were considered as an evidence of pathological state. After screening analysis of blood sera from patients with various forms of malignant tumors the PAP activity above 0.15 un/L was observed in 20 % of the patients; the enzymatic activity exceeded these values in 54 % of patients with ovary carcinoma. The data obtained suggest that the procedure developed as an adequate means for estimation of thermostable PAP isoenzymes as well as that the rate of PAP activity might serve as marker of malignancy in ovary and testis carcinomas independently on level of total activity of alkaline phosphatase.

thy persons and of 72 oncologic patients, using solid-phase immunoenzymatic analysis with polyclonal antibodies towards PAP. The enzyme was detected both in blood serum of healthy persons and of oncologic patients. The blood serum under study was preheated at 65° in order to inactivate the intestinal phosphatase — the only isoenzyme cross-reacting with antibodies to thermostable PAP. This controlled heating treatment decreased distinctly the possibility of pseudopositive reactions. The limiting values of the PAP activity were about 0.15 un/L in blood sera of healthy persons. Higher values were considered as an evidence of pathological state. After screening analysis of blood sera from patients with various forms of malignant tumors the PAP activity above 0.15 un/L was observed in 20 % of the patients; the enzymatic activity exceeded these values in 54 % of patients with ovary carcinoma. The data obtained suggest that the procedure developed as an adequate means for estimation of thermostable PAP isoenzymes as well as that the rate of PAP activity might serve as marker of malignancy in ovary and testis carcinomas independently on level of total activity of alkaline phosphatase.

УДК 612.751.2.015.348:577.112.34].08

Ф. Е. Романцев, В. Н. Прозоровский, Е. А. Козлов, Д. А. Карпов,
Е. Л. Требухина, А. А. Ржанинова

ОПРЕДЕЛЕНИЕ АМИНОКИСЛОТНОГО СОСТАВА ХРЯЩЕВОЙ ТКАНИ И ИЗОФЕРМЕНТОВ КРЕАТИНФОСФОКИНАЗЫ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ФЕНИЛТИОКАРБАМИЛЬНЫХ ПРОИЗВОДНЫХ АМИНОКИСЛОТ

НИИ медицинской энзимологии АМН СССР, Москва

В настоящее время наиболее распространенным и эффективным методом определения содержания аминокислот (АК) является жидкостная хроматография высокого давления, которая применяется в двух вариантах: с предколоночной или постколоночной модификацией аминокислот. Многочисленные методы постколоночной дериватизации, основанные на использовании нингидрина [12, 16], о-фталевого альдегида [4, 8], флюорескамина [6, 18, 21, 22], а также методы предколоночной модификации с применением данзилхлорида [2, 10, 15, 23], дабсилхлорида [7, 20] и о-фталевого альдегида [3, 5, 9, 13], как правило, имеют один из следующих недостатков: нестабильность производных АК; необходимость установки второго и третьего постколоночного реактора; невозможность одновременной идентификации пролина, оксипролина и основных АК; необходимость

использования инертного газа при хроматографии; трудности, связанные со спецификой спектральной регистрации производных АК.

Наиболее перспективным и, вероятно, более совершенным является метод Хейприксон и Мереди, основанный на модификации АК с помощью фенилизотиоцианата с последующим их разделением методом обращенно-фазной хроматографии [11]. Однако этот метод имеет ряд недостатков: высокая токсичность растворителей, используемых при хроматографии (ацетонитрил, метанол), отсутствие более коротких программ разделения АК, необходимых для ускоренного проведения анализа в целом (для экспресс-анализа). С другой стороны, необходимы также и более продолжительные программы, отличительной чертой которых является повышенная разрешающая способность и возможность проводить идентификацию как

основных АК, так и тех, которые представляют интерес для изучения биохимии коллагена, а именно — ди- и моногликозидов оксилизина, пролина, оксипролина и оксилизина.

С целью разработки метода определения аминокислотного состава, основанного на использовании стабильных, доступных, малотоксичных и не требующих дополнительной очистки и специального хранения реактивов, а также для создания различных по продолжительности программ анализа нами предложен способ разделения фенилтиокарбамильных (ФТК) производных АК на октадецильных силикагелевых сорбентах с использованием градиентной элюции этанолом и ацетатом натрия или аммония.

Методика

Для приготовления элюентов и ФТК-производных АК использовали деионизованную воду, этанол ректификат и отечественные реактивы марки х.ч. и ч.д.а. без дополнительной очистки. Дериватизацию АК фенилизотиоцианатом фирмы «Fluka» (Швейцария) проводили при щелочном pH по методу Хейнриксон и Мередит [11].

Хроматографическое разделение выполняли на программируемом градиентном жидкостном хроматографе Altex 324 с аналитическим УФ-детектором-153 и системой математической и графической обработки хроматограмм Shimadzu 901. В экспериментах использовали стандартные наборы АК производства фирм «Sigma» (США) и «Serva» (ФРГ), В-цепь инсулина быка и лейцил-глицил-глицин производства «Serva» (ФРГ).

ММ-изофермент креатинфосфокиназы был выделен из скелетной мускулатуры свиньи по методу Такасава [19]. ВВ-креатинфосфокиназу из мозга свиньи выделяли с использованием двойной ионообменной хроматографии на ДЭАЭ-целлюлозе с последующей хроматографией на гидроксилапатите. Гидролиз 100—300 мкг белка проводили в 6 н. хлористоводородной кислоте в течение 24 ч при 102,5 °С в запаянных под азотом ампулах.

Для определения содержания коллагено-специфичных АК 50 мг хряща гидролизовали в 1 мл 2 н. NaOH в течение 16—18 ч при 105 °С в герметически закрытых пробирках и по методу Spigo [17] выделяли суммарные АК из гидролизата.

Результаты и обсуждение

Реакция фенилизотиоцианата с АК в щелочной среде приводит к образованию ФТК-производных (ФТК-АК). В результате этого значительно увеличивается гидрофобность АК, что позволяет применить обращению-фазную хроматографию для разделения ФТК-АК на сорбентах типа C_8 и C_{18} . Мо-

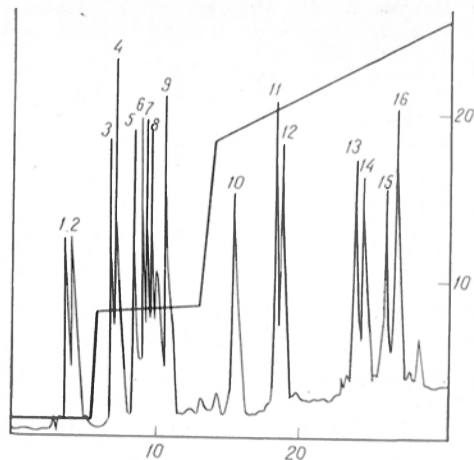


Рис. 1. Разделение ФТК-АК на сорбенте C_{18} с использованием градиентной элюции ацетатом натрия и этанолом.

Предколонка: C_{18} 4,6X30 мм; колонка: Ultrasil ODS dp 5 мкм, 4,6X250 мм. Температура колонки и предколонки 45 °С. Буфер А: 0,05 М CH_3COONa pH 6,8. Буфер В: 80 % — C_2H_5OH , 20 % — 0,1 М CH_3COONa pH 6,8. Образец объемом 10 мкл содержит по 2 нмоль каждой АК. Скорость элюции 1,3 мл/мин. Здесь и на рис. 3 и 4: 1 — аспарагиновая кислота, 2 — глутаминовая кислота, 3 — серин, 4 — глицин, 5 — гистидин, 6 — треонин, 7 — аланин, 8 — аргинин, 9 — пролин, 10 — тирозин, 11 — метионин, 12 — валин, 13 — изолейцин, 14 — лейцин, 15 — фенилаланин, 16 — лизин. Здесь и на рис. 2—4 — по оси абсцисс — время удерживания, мин; по оси ординат: слева — оптическая плотность при длине волны 254 нм, справа — концентрация буфера В, %.

дификация лизина происходит по двум аминокислотным группам, что выражается в соответствующем двойном увеличении площади пика по сравнению со средним значением для других АК. Наиболее короткая программа определения аминокислотного состава на сорбенте типа C_{18} с использованием этанола и ацетата натрия представлена на рис. 1. Дальнейшее сокращение общей продолжительности разделения еще на 5—6 мин может быть достигнуто увеличением доли буфера В (с 1 до 6 мин на 1 %, с 7 до 13 мин на 2 % и с 14 до 26 мин на 2,5 %). Однако это нецелесообразно, поскольку такой вариант приводит к уменьшению разрешающей способности и создает трудности при практическом применении данной программы для анализа гидролизатов, в которых молярное содержание «соседних» АК (например, метионина и валина) различается в несколько раз.

К настоящему времени в литературе отсутствуют сведения о применении хроматографического метода для одновременного определения содержания основных и специфических АК

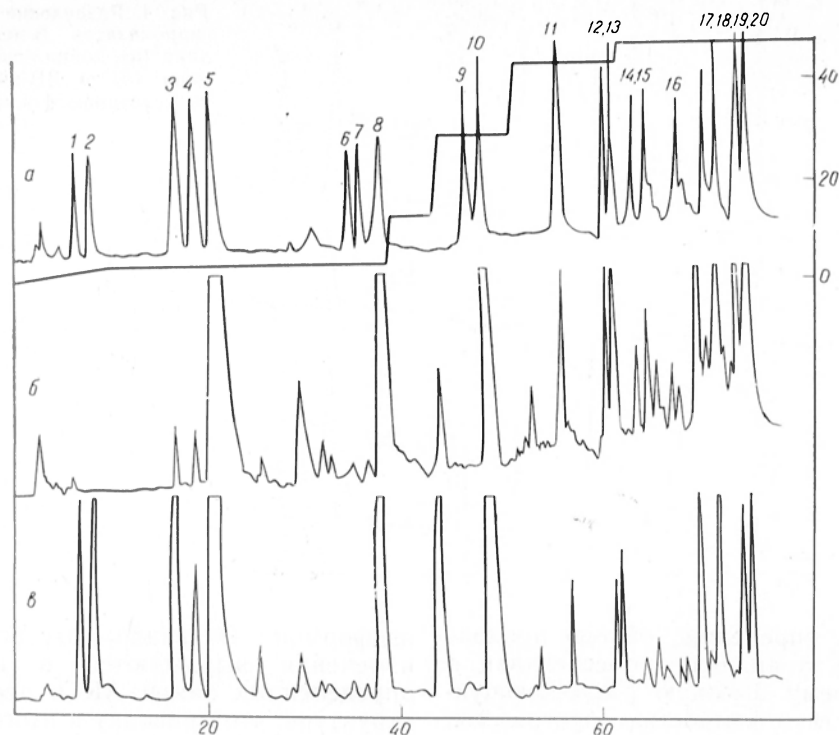


Рис. 2. Разделение ФТК-АК с использованием градиентной элюции уксетатом аммония и этанолом.

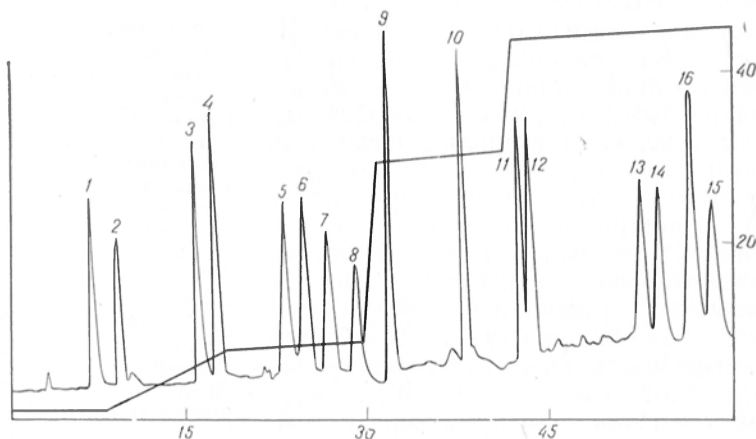
Предколонка: Silasorb C₈ 4,6×30 мм; колонка: Ultrasphere 1P dp 5 мкм, 4,6×250 мм. Температура колонки и предколонки 45 °С. Скорость элюции 1 мл/мин. Буфер А: 0,05 М CH₃COONH₄, pH 6,8. Буфер В: 50 % — C₂H₅OH, 50 % — 0,1 М CH₃COONH₄, pH 6,8. а: 1 — аспарагиновая кислота, 2 — глутаминовая кислота, 3 — оксипролин, 4 — серин, 5 — глицин, 6 — гистидин, 7 — треонин, 8 — аланин, 9 — аргинин, 10 — пролин, 11 — тирозин, 12 — метионин, 13 — валин, 14 — дигликозид оксипролина, 15 — моногликозид оксипролина, 16 — оксипролин, 17 — изолейцин, 18 — лейцин, 19 — лизин, 20 — фенилаланин. Образец объемом 15 мкл содержит по 1 нмоль каждой АК; б — гидролизат хрящевой ткани; норма. Объем образца 15 мкл; в — гидролизат хрящевой ткани; патология — воронкообразная деформация грудной клетки, III стадия, синдром Элерса — Данлоса. Объем образца 15 мкл.

коллагена, а именно — пролина, оксипролина, оксипролина, ди- и моногликозидов оксипролина. Для определения аминокислотного состава при решении задач, связанных с исследованиями в области биохимии соединительной ткани, была создана 76-минутная про-

грамма для разделения в одном цикле основных и коллагеноспецифичных АК (рис. 2, а). Одна из главных задач разработки данной программы заключалась в достижении высоких значений разности времени удерживания для соседних пиков. Этот параметр во

Рис. 3. Разделение калибровочного набора ФТК-АК.

Предколонка: C₁₈ 4,6×30 мм; колонка: Ultrasphere 1P dp 5 мкм, 4,6×250 мм. Температура колонки и предколонки 45 °С. Скорость элюции 1 мл/мин. Буфер А: 0,05 М CH₃COONH₄, pH 6,85. Буфер В: 50 % — C₂H₅OH, 50 % — 0,1 М CH₃COONH₄, pH 6,85. Объем образца 10 мкл. Количество каждой АК 2,5 нмоль.



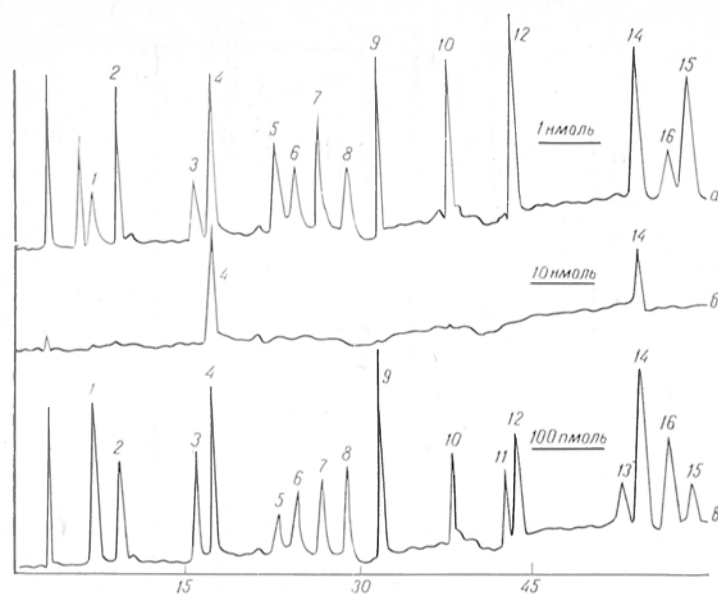


Рис. 4. Разделение ФТК-АК гидролизатов В-цепи инсулина (а), лейцил-глицил-глицина (б) и ВВ-изофермента креатинфосфокиназы (в).

многом и определил общую продолжительность анализа, обеспечивая в то же время высокую разрешающую способность и «емкость» программы, потенциально подготовленной для анализа более многокомпонентных образцов. Анализ щелочных гидролизатов хрящевой ткани показал возможность количественного определения оксипролина, оксилизина, галактозил-оксилизина и глюкозил-галактозил-оксилизина при их различном содержании в норме и при патологии (рис. 2, б, в).

Для определения аминокислотного состава ММ- и ВВ-изоформ креатинфосфокиназы свиньи была разработана программа разделения (рис. 3). Проверку адекватности результатов, получаемых при использовании данной программы, и определение относительного диапазона чувствительности проводили путем анализа гидролизатов двух стандартных образцов: В-цепи инсулина быка и трипептида лейцил-глицил-глицин (рис. 4, а, б). Анализ ВВ-изоформ креатинфосфокиназы (рис. 4, в) позволил установить состав В-субъединицы (см. таблицу), увеличение содержания неполярных АК (в частности, аланина, пролина и лейцина) и уменьшение содержания положительно заряженных АК при сравнении с составом М-субъединицы. Этот факт является причиной большей гидрофобности и меньшей электрофоретической подвижности ВВ-изофермента в целом по сравнению с ММ-

изоформой. Очевидно, что подобные изменения выражаются в наличии определенных замен АК в первичной структуре, что приводит в итоге к увеличению липофильности полипептида и уменьшению его отрицательного заряда. Аналогичные изменения отмечаются при сравнении составов М- и В-субъединиц креатинфосфокиназы из других источников (в частности, из кролика [14]) и характеризуют эволюционно закрепленные различия в структуре субъединиц.

При отработке и оптимизации метода определения аминокислотного состава с использованием октадецильных сорбентов, ацетата аммония и

Аминокислотный состав М- и В-субъединиц креатинфосфокиназы

| АК | Свинья | | Кролик [14] | |
|-----------------------|--------|----|-------------|----|
| | М | В | М | В |
| Аспарагиновая кислота | 30 | 32 | 28 | 30 |
| Глутаминовая кислота | 27 | 26 | 27 | 27 |
| Серин | 20 | 22 | 22 | 21 |
| Глицин | 33 | 36 | 33 | 32 |
| Гистидин | 15 | 13 | 17 | 14 |
| Треонин | 18 | 18 | 18 | 18 |
| Аланин | 14 | 20 | 13 | 22 |
| Аргинин | 18 | 22 | 18 | 21 |
| Пролин | 20 | 25 | 19 | 20 |
| Тирозин | 10 | 10 | 10 | 7 |
| Валин | 26 | 21 | 28 | 24 |
| Метионин | 10 | 10 | 10 | 11 |
| Изолейцин | 14 | 12 | 14 | 14 |
| Лейцин | 36 | 40 | 37 | 41 |
| Лизин | 34 | 18 | 34 | 20 |
| Фенилаланин | 16 | 16 | 16 | 18 |

этанол, ФТК-АК могут быть разделены на 3 группы в соответствии с их гидрофобностью, характеристикой которой является время удерживания на фазе в зависимости от концентрации органического растворителя: I группа — аспарагиновая и глутаминовая кислоты, оксипролин, серин, глицин, гистидин, треонин, аланин, II — аргинин, пролин, тирозин, III — метионин, валин, гликозиды оксипролина, оксипролин, изолейцин, лейцин, лизин и фенилаланин. Такое деление является в определенном смысле ключом к составлению программы любой продолжительности, поскольку наилучшее разделение достигается в том случае, если ФТК-АК одной группы элюируются слабым линейным градиентом, близким к изократическому режиму. II группа является промежуточной и в зависимости от характеристик колонки и условий хроматографии может частично входить в состав I или III группы либо занимать относительно самостоятельное положение.

Таким образом, предложенные методы хроматографического разделения ФТК-АК позволяют проводить эффективное определение аминокислотного состава различных биологических образцов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Остерман Л. А. Хроматография белков и нуклеиновых кислот. — М., 1985.
2. Bayer E., Grom E., Kallenegger B., Uhman R. // *Analyt. Chem.* — 1976. — Vol. 48. — P. 1106—1109.
3. Benson J. R., Hare P. E. // *Proc. nat. Acad. Sci. USA.* — 1975. — Vol. 72. — P. 619—622.
4. Bohlen P., Mellet M. // *Analyt. Biochem.* — 1979. — Vol. 94. — P. 313—321.
5. Bohlen P., Schroeder R. // *Ibid.* — 1982. — Vol. 126. — P. 144—152.
6. Bohlen P., Stein S., Stone J., Udenfriend S. // *Ibid.* — 1975. — Vol. 67. — P. 438—445.
7. Chang J. Y., Martin P., Bernasconi R., Brann D. G. // *FEBS Lett.* — 1981. — Vol. 132. — P. 117—120.
8. Cooper J. D. H., Lewis M. T., Turnell D. C. // *J. Chromatogr.* — 1984. — Vol. 285. — P. 484—487.
9. Cronin J. R., Hare P. E. // *Analyt. Biochem.* — 1977. — Vol. 81. — P. 151—156.
10. Engelhart H., Asshauer J., Neve U., Weigand

- N. // *Analyt. Chem.* — 1974. — Vol. 46. — P. 336—340.
11. Heinrichson R. L., Meredith S. C. // *Analyt. Biochem.* — 1984. — Vol. 136. — P. 65—74.
12. Moore S., Spackman D. H., Stein W. H. // *Analyt. Chem.* — 1958. — Vol. 30. — P. 1185—1190.
13. Pfeifer R., Karol R., Korpi J. et al. // *Amer. Lab.* — 1983. — March. — P. 78—87.
14. Roman D., Billadello J., Gordon J. et al. // *Proc. nat. Acad. Sci. USA.* — 1985. — Vol. 82. — P. 8394—8398.
15. Schmidt G. J., Olson D. C., Slavin W. // *J. Liq. Chromatogr.* — 1979. — Vol. 2. — P. 1031—1045.
16. Spackman D. H., Stein W. H., Moore S. // *Analyt. Chem.* — 1958. — Vol. 30. — P. 1190—1206.
17. Spiro R. G. // *J. biol. Chem.* — 1967. — Vol. 242. — P. 4813—4823.
18. Stein S., Udenfriend S. // *Analyt. Biochem.* — 1984. — Vol. 136. — P. 7—23.
19. Takasawa T., Shiokawa H. // *J. Biochem.* — 1983. — Vol. 93. — P. 383—388.
20. Tenni R., Rimoldi D., Zanabony G. et al. // *Ital. J. Biochem.* — 1984. — Vol. 33. — P. 117—127.
21. Udenfriend S., Stein S., Bohlen P. et al. // *Science.* — 1972. — Vol. 178. — P. 871—872.
22. Weigle M., De Bernardo S. L., Teng J. P., Leimgruber W. // *J. Amer. chem. Soc.* — 1972. — Vol. 94. — P. 4052—4054.
23. Wilkinson J. M. // *J. Chromatogr. Sci.* — 1979. — Vol. 16. — P. 547—552.

Поступила 27.11.87

ESTIMATION OF AMINO ACID COMPOSITION OF CARTILAGE TISSUE AND CREATINE PHOSPHOKINASE ISOZYMES USING PHENYLTHIOCARBAMYL DERIVATIVES OF AMINO ACIDS

F. E. Romantsev, V. N. Prozorovsky, E. A. Kozlov, D. A. Karpov, E. L. Trebukhina, A. A. Rzhabinova

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

A method for estimation of amino acid composition and collagen-specific amino acids was developed. The assay was based on the precolumn reaction of amino acids with phenylisothiocyanate. The phenylthiocarbamyl derivatives were analyzed by means of reverse-phase chromatography on octadecyl sorbents, which involved gradient elution with ethanol and sodium or ammonium acetate. The method was used for effective separation of collagen-specific and main amino acids in cartilage hydrolysate from healthy persons and of patients with funnel chest and Ehlers-Danlos syndrome and also for determination of amino acid composition in creatine phosphokinase B- and M-subunits.