

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

Архив журнала

Вопросы медицинской химии

ISSN 0042-8809

1989

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

1989

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 35

БЫПУСК 5

СЕНТЯБРЬ — ОКТЯБРЬ

Двухмесячный научно-теоретический журнал

Основан в 1955 г.



МОСКВА · МЕДИЦИНА · 1989

ВОПРОСЫ МЕДИЦИНСКОЙ ХИМИИ



РЕДАКЦИОННАЯ КОЛЛЕГИЯ:

Главный редактор С. С. ДЕБОВ

В. Б. СПИРИЧЕВ (зам. редактора), И. П. АШМАРИН, Т. Т. БЕРЕЗОВ, А. В. 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)
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)
ЯКОВЛЕВ Н. Н. (Ленинград)
ЯСАЙТИС А. А. (Вильнюс)

ESTIMATION OF RAT BLOOD PLASMA CORTICOSTERONE BY MEANS OF ADSORPTION MICRO-HPLC

A. M. Khokha

Institute of Biochemistry, Academy of Sciences of the Byelorussian SSR, Grodno

A simple and sensitive procedure is developed for estimation of corticosterone in rat blood plasma. The procedure involved extraction

of the substance with methylene chloride in alkaline medium followed by adsorption micro-HPLC on Silasorb 600 in the system of chloroform-methanol using cortisone as an internal standard. The assay enabled to estimate as low as 10 pmole of corticosterone per a sample within 20 min (including 6 min for the chromatographic separation). Efficiency of the assay was confirmed by dynamic estimations of corticosterone content in rat blood during acute alcohol intoxication.

УДК 616.151.55-078.73

О. А. Маркова, В. В. Калашников, В. Б. Хватов

ИММУНОФЕРМЕНТНЫЙ МЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ АНТИТРОМБИНА III

Институт скорой медицинской помощи им. Н. В. Склифосовского, Москва

Антитромбин III (АТ III), или кофактор гепарина, — регулятор свертывающей системы крови человека. Определение его содержания имеет важное значение при ряде заболеваний [2, 9, 12, 17]. Установлено, что снижение уровня АТ III является ранним диагностическим признаком появления тромбофилического состояния и начальных признаков синдрома диссеминированного внутрисосудистого свертывания крови [2, 10].

В настоящее время в клинических целях АТ III определяют с помощью ряда методик: коагулологических [1, 7], спектрофотометрических с применением хромогенных субстратов [8, 16] и иммунохимических [11, 15, 18].

Недостатком коагулологических и спектрофотометрических методов является неадекватность исследования АТ III при проведении гепаринотерапии. Кроме того, низкая чувствительность не позволяет оценить уровень этого ингибитора в биологических жидкостях (спинномозговая, слезная, моча) с низким его содержанием. Эти методы также характеризуются относительной специфичностью, так как регистрируют общую антитромбиновую активность. В последние годы все шире распространяются и внедряются в клиническую лабораторную службу иммунохимические методы, которые лишены отмеченных недостатков и позволяют дать количественную оценку антигена АТ III.

Целью настоящей работы явились разработка, стандартизация иммуноферментного метода (ИФМ) определе-

ния АТ III и его апробация при ряде заболеваний.

Методика

В работе использовали очищенный препарат АТ III человека, выделенный из плазмы крови методом аффинной хроматографии на гепаринсефарозе 4В [4].

Антисыворотку к АТ III получали на кроликах породы шиншилла массой 4,0—6,0 кг. Применяли следующую схему иммунизации: 2 мг АТ III в 1 мл воды в смеси с равным объемом полного адъюванта Фрейнда вводили подкожно в оба глаза и подкожно в 5—6 точек. Впоследствии проводили 3 инъекции этого же количества белка с интервалом 9 дней, чередуя способы введения (подкожно, внутримышечно, подкожно).

Кровь забирали на 7-й день после последней инъекции из краевой вены уха кролика, в течение 20 дней. Полученную антисыворотку консервировали азидом натрия (0,2 %) и хранили в течение 2—3 лет без потери активности при 4 °С.

Анализ антисывороток проводили с помощью перекрестного иммуоэлектрофореза по Лауреллю [13] и иммунодиффузионного анализа со стандартной тест-системой по Н. И. Храмковой и Г. И. Абселеву [6]. Содержание общего белка определяли по методу Лоури [14].

Антитела к АТ III выделяли из антисывороток методом аффинной хроматографии на иммуносорбенте, приготовленном на основе CN—Br-сефарозы и очищенного препарата белка. Затем их лиофильно сушили и хранили при 4 °С.

Конъюгирование антител с пероксидазой из хрена (Олайнский завод химреактивов, марка А, активность 659 ед.) проводили методом периодатного окисления [19]. Полученный конъюгат хранили с добавлением 0,5 % бычьего сывороточного альбумина и 40 % глицерина при —20 °С в течение 1 года без потери активности.

Выбор оптимальной концентрации антител для иммобилизации на твердой фазе и определение разведения конъюгата проводили

опытным путем. Для этого использовали на 1-м этапе различные концентрации антител к АТ III, на 2-м этапе — разные разведения конъюгата антител с ферментом, на 3-м этапе — различные разведения стандарта для построения калибровочной кривой.

Выбирали систему, состоящую из такого соотношения иммобилизованных антител и разведения конъюгата, при которой ΔE_{450} опытной пробы верхней точки рабочего отрезка калибровочной кривой находилась в пределах 1 опт. пл.

Принципиальная схема иммуоферментного определения АТ III состояла из следующих этапов: 1) иммобилизация антител к АТ III на твердой фазе; 2) отмывка несвязывающихся антител и нанесение исследуемых проб; 3) отмывка от несвязавшихся компонентов испытуемого образца и нанесение антител к АТ III, меченных ферментом; 4) отмывка от несвязавшихся компонентов конъюгата и определение ферментной активности; 5) регистрация полученных данных.

Приготовление реактивов для постановки иммуоферментного метода: а) «покрывающий» карбонатный буфер (рН 9,6): Na_2CO_3 — 1,59 г, NaHCO_3 — 2,93 г, NaN_3 — 0,2 г, H_2O — до 1000 мл; б) забуференный физиологический раствор с твином-20 (рН 7,4): NaCl — 8,5 г, KH_2PO_4 — 0,2 г, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$ — 2,9 г, KCl — 0,2 г, твин-20 — 0,5 мл, H_2O до 1000 мл; в) субстратная смесь для появления активности пероксидазы: 20 мг 5-аминосалициловой кислоты («Merck», ФРГ) растворяли при нагревании в 25 мл дистиллированной воды, охлаждали и доводили рН раствора до 6,0, добавляя 0,1 мл 1 н. раствора NaOH . В 25 мл смеси вносили 0,01 мл 33 % H_2O_2 , перемешивали и немедленно использовали.

Ход определения. В качестве твердой фазы применяли гибкие планшеты фирмы «Flow» (Англия), предназначенные для иммуоферментного анализа. «Посадку» антител на твердую фазу проводили в «покрывающем» карбонатном буфере (рН 9,6) в течение ночи при 4 °С, внося в каждую ячейку по 150 мкл раствора. На следующий день проводили 3-кратную отмывку несвязавшихся антител забуференным физиологическим раствором с твином-20 и водопроводной водой поочередно.

Отмытые ячейки заполняли по 150 мкл в следующем порядке: 1-й ряд (контрольный) — забуференным физиологическим раствором; 2-й ряд — последовательными разведениями стандартного препарата АТ III; 3—12-й ряды — пробами исследуемых образцов.

Каждую пробу плазмы (сыворотки) крови анализировали трижды при оптимальном разведении 1 : 2000 забуференным физиологическим раствором. Планшеты с нанесенными образцами инкубировали при 37 °С в течение 30 мин, после чего снова повторяли отмывку.

Затем ячейки заполняли разведенным конъюгатом антител с ферментом по 150 мкл каждую. Инкубировали при 37 °С в течение 30 мин и вновь проводили отмывку планшеты от несвязавшихся компонентов.

Проявление активности пероксидазы проводили субстратной смесью (150 мкл) в течение 30 мин при комнатной температуре и непрерывном встряхивании. Результаты оценивали спектрофотометрически на многоканальном спектрофотометре («Flow») при длине волны 450 нм. Содержание АТ III в исследуемых образцах определяли по стандартной калибровочной кривой, которую строили для каждого

планшета отдельно.

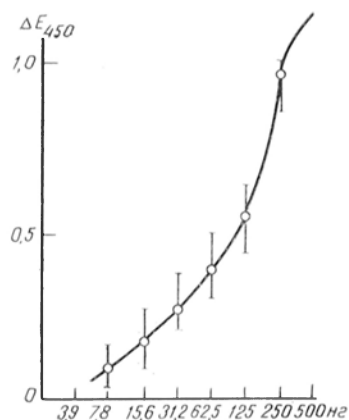
Для апробации разработанного метода (ИФМ) исследована плазма крови 76 больных и 21 донора. АТ III анализировали на 1-е сутки поступления в стационар у больных с острым крупноочаговым инфарктом миокарда ($n=22$), острым холециститом ($n=10$) и с экзогенными отравлениями фосфорорганическими инсектицидами (ФОИ) ($n=22$), психотропными препаратами ($n=17$) и дихлорэтаном ($n=5$).

Результаты и обсуждение

Полученная антисыворотка к АТ III человека имела титр 1:16—1:32. Иммуноэлектрофоретический анализ показал, что она моноспецифична. Это подтверждает единственная дуга преципитации, образованная антисывороткой с белками плазмы крови донора и очищенным препаратом АТ III. Методом иммунодиффузии доказана идентичность антисывороток, приготовленных нами и фирмой «Calbiochem-Behring corp.» (США).

Выделенные из антисыворотки антитела к АТ III стандартизировали: как антиген — с помощью антисыворотки к иммуноглобулинам кролика (титр составлял 1:128), как антитела — с помощью стандартной тест-системы (титр 1:32). Рассчитано [3], что концентрация антител соответствовала 2,5 мг/мл. Это позволило определить, что преципитирующие антитела в выделенном препарате составляли 80 % а их выход с 1 мл антисыворотки — 0,15 мг.

При отработке условий проведения ИФМ показано, что оптимальная концентрация антител для иммобилизации



Калибровочная кривая для ИФМ при определении содержания АТ III.

По оси абсцисс — концентрация АТ III (в нг/мл); по оси ординат — разница оптической плотности опытной и контрольной проб при 450 нм.

Точность и воспроизводимость калибровочной кривой для ИФМ при определении АТ III

Концентрация, нг/мл	Количество определений	Доверительный интервал, ΔE_{450}	Средняя величина, ΔE_{450}	Статистическое отклонение	Коэффициент вариации, %
7,8	11	0,050—0,180	0,090	$\pm 0,070$	26,5
15,6	11	0,100—0,280	0,190	$\pm 0,070$	24,9
31,2	11	0,219—0,389	0,281	$\pm 0,050$	18,4
62,5	11	0,314—0,533	0,406	$\pm 0,070$	19,2
125,0	11	0,440—0,646	0,545	$\pm 0,070$	13,4
250,0	11	0,862—1,070	0,972	$\pm 0,060$	6,2

их на твердой фазе — 5 мкг/мл, а разведение конъюгата — 1 : 300.

На рисунке представлена калибровочная кривая определения АТ III в исследуемых образцах. Рабочий отрезок — линейная ее часть — соответствовал концентрации АТ III от 7,8 до 125 нг/мл. Чувствительность ИФМ составляла 7,8 нг/мл АТ III. Результаты проверки разработанной тест-системы представлены в табл. 1. Она отличается достаточно высокой точностью, надежностью, воспроизводимостью и отвечает основным требованиям, предъявляемым к серологическим тест-системам [5].

В табл. 2 приведены результаты клинической апробации ИФМ при определении АТ III в норме и при некоторых патологических состояниях. В норме содержание АТ III у доноров варьировало от 160 до 250 мкг/мл (в среднем $198 \pm 10,5$ мкг/мл). Отмечалось снижение уровня АТ III у больных с острым холециститом — до $163,0 \pm 18,5$ мкг/мл (на 18 % от нормы), а при отравлении — до $126,6 \pm 15,2$ мкг/мл. Причем у больных с от-

равлениями четко выявляется связь степени снижения содержания АТ III с тяжестью интоксикации, вызванной употреблением различных экзотических ядов (ФОИ, психотропных препаратов, дихлорэтана). Это, очевидно, обусловлено массивным потреблением АТ III в процессе развития ДВС крови у больных с экзогенными отравлениями. Наблюдалось статистически значимое ($p < 0,001$) повышение уровня АТ III в плазме крови у больных при остром крупноочаговом инфаркте миокарда на 1-е сутки поступления.

Таким образом, ИФМ при оценке содержания АТ III можно рекомендовать в повседневную клиническую практику ввиду его высокой информативности.

ЛИТЕРАТУРА

1. Андреев Г. В. // Методы исследования фибринолитической системы крови. — М., 1981. — С. 81—82.
2. Бишевский К. М. Антитромбин III и гепаринрезистентность плазмы при ДВС-синдромах, микротромбоваскулитах и тромбозах: Автореф. дис. ... канд. мед. наук. — Л.; Новосибирск, 1984. — С. 17—19.
3. Калашиников В. В., Фалалеева Д. М., Татаринов Ю. С. // Экспер. онкол. — 1982. — № 5. — С. 47—50.
4. Маркова О. А., Калашиников В. В., Хватов В. Б. // Вopr. мед. химии. — 1987. — № 3. — С. 62—66.
5. Ткачева Г. А., Балаболкин М. И., Ларичева И. П. Радионуклеохимические методы исследования. — М., 1983. — С. 86—96.
6. Храмова Н. И., Абелев Г. И. // Бюл. экспер. биол. — 1961. — № 12. — С. 107.
7. Abildgaard V., Gravest J., Godal H. C. // Thrombos. Diathes. haemorrh. (Stuttg.). — 1970. — Bd 24, N 1—2. — S. 224—229.
8. Abildgaard V. // Thrombos. Res. — 1977. — Vol. 11. — P. 549.
9. Auroseau M. H., d'Angeli J. L., Josso F. // Haemostasis. — 1980. — Vol. 10. — P. 104—107.
10. Bick R. L., Bick M. D., Fekete L. F. // Amer. J. clin. Path. — 1980. — Vol. 73. — P. 577—582.
11. Grimmer Q., Fagerhol M. K. // Int. J. Pept. Protein Res. — 1977. — Vol. 9. — P. 85—90.

Таблица 2

Уровень АТ III в плазме крови в норме и при патологии ($M \pm m$)

Нозология	Количество образцов	Содержание АТ III, мкг/мл	p
Острый крупноочаговый инфаркт миокарда	22	$220,0 \pm 6,3$	$< 0,001$
Острый холецистит	10	$163,0 \pm 18,5$	$< 0,01$
Отравление: ФОИ; психотропными препаратами; дихлорэтаном	22	$185,9 \pm 11,9$	$< 0,001$
	17	$134,7 \pm 10,2$	$< 0,001$
	5	$126,6 \pm 15,2$	$< 0,01$
Доноры	21	$198,0 \pm 10,5$	

12. Kaufmann R. H. et al. // Amer. J. Med. — 1978. — Vol. 65. — P. 607—613.
13. Laurell G.-B. // Analyt. Biochem. — 1966. — Vol. 15. — P. 45—52.
14. Lowry O. H., Rosebrough N. L., Farr A. L., Randall R. J. // J. biol. Chem. — 1951. — Vol. 193, N 1. — P. 265—275.
15. Napoli V. M. // Amer. J. clin. Path. — 1985. — Vol. 84, N 2. — P. 173—179.
16. Qdegard O. R., Lie M., Abildgaard V. // Thrombos. Res. — 1975. — Vol. 6. — P. 287—294.
17. Schipper H. G. et al. // Ibid. — 1981. — Vol. 21, N 1—2. — P. 73—80.
18. Tanaka M., Kato K. // Ibid. — Vol. 22, N 1—2. — P. 67—74.
19. Wilson M. B., Nakana P. K. // Immuno-fluorescence and Related Staining Techniques / Eds. W. Knapp et al. — Amsterdam, 1978. — P. 215—225.

Поступила 23.10.88

IMMUNOENZYMATIC ASSAY FOR ESTIMATION OF ANTITHROMBIN III

O. A. Markova, V. V. Kalashnikov, V. B. Khvatov

N. V. Sklifosovsky Institute of Urgent Medicine, Moscow

Immunoenzymatic assay is developed for estimation of antithrombin III (AT-III). Sensitivity of the assay was 7.8 ng of AT-III per 1 ml. The test system developed corresponded to the requirements for serological assays. Estimation of AT-III in blood plasma of healthy persons and in patients with various diseases showed that the assay may be recommended for clinical practice.

УДК 612.124:577.112.825].083.33

Е. И. Зарайский, С. В. Назимова, Г. А. Олефиренко, Э. М. Пчелкина,
Д. Д. Петрунин, Ю. С. Татаринов, Б. Б. Фукс

ИММУНОФЕРМЕНТНЫЙ АНАЛИЗ ПЛАЦЕНТА-СПЕЦИФИЧЕСКОГО АЛЬФА₁-МИКРОГЛОБУЛИНА В СЫВОРОТКЕ КРОВИ ДОНОРОВ

НИИ морфологии человека АМН СССР, Москва, II ММИ им. Н. И. Пирогова

Плацента-специфический альфа₁-микроглобулин (ПАМГ-1) был впервые идентифицирован как органоспецифический белок плаценты человека, секретируемый в амниотическую жидкость [1]. ПАМГ-1 был выделен в чистом виде, дана характеристика его физико-химических свойств [2]. Впоследствии он обнаружен в фолликулярной жидкости и желтом теле [7], семенных пузырьках и семенной плазме [8], ткани эндометрия [5] и менструальной жидкости [6]. Иммунохимически сходный плацентарный белок позднее был описан под названием «плацентарный протеин-12» (ПП-12) [3].

В связи с низким содержанием ПАМГ-1 в сыворотке крови для его определения и количественного анализа требуются высокочувствительные методы. Для этих целей был разработан радиоиммунологический метод определения ПП-12 [9]. Однако для применения этого метода в широкой клинической практике требуются специальные радиоиммунологические наборы и соответствующим образом оборудованные лаборатории.

Целью настоящей работы явилась разработка высокочувствительного ме-

тода иммуноферментного анализа для количественного определения ПАМГ-1 в сыворотке крови здоровых мужчин и женщин (доноров).

Методика

Образцы сывороток крови, полученные от здоровых мужчин и женщин, были заморожены и хранились при —20 °С в полиэтиленовых пробирках. ПАМГ-1 выделяли из амниотической жидкости во II триместре беременности по описанному ранее методу [2]. Для получения антисыворотки очищенными препаратами ПАМГ-1 иммунизировали кроликов (1 мг/кг внутримышечно с полным адъювантом Фрейнда трижды с недельным интервалом). Через 4 нед проводили реиммунизацию без адъюванта, после которой на 7, 9 и 11-е сутки брали кровь из краевой вены уха. Полученную антисыворотку истощали сухой плазмой крови доноров.

Выделение антител. Очищенный ПАМГ-1 сорбировали на колонке с цианбромированной сефарозой (тип 6МВ; «Pharmacia», Швеция), подготовленной по инструкции, прилагаемой к сефарозе. Препарат ПАМГ-1 из расчета 10 мг на 1 г сухой сефарозы диализовали против 0,1 М NaHCO₃, содержащего 0,5 М NaCl, смешивали с гелем сефарозы и инкубировали при комнатной температуре в течение 2 ч на магнитной мешалке. Несвязавшийся белок отмывали избытком 0,1 М NaHCO₃. Затем гель трижды промывали поочередно 0,1 М ацетатным буфером, содержащим 0,5 М NaCl (рН 4,0), и 0,1 М боратным буфером, содержащим 0,5 М NaCl (рН 8,0). Колонку урав-