

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)

24. Valenzuela A., Lagos C., Schmidt K., Videla L. A. // Biochem. Pharmacol. — 1985. — Vol. 34, N 12. — P. 2209—2212.

Поступила 06.12.88

EFFECT OF TETRACYCLINE AND SILIBORE ON LIPID PEROXIDATION IN RAT LIVER TISSUE OF VARIOUS AGE GROUPS

V. V. Lemeshko, E. G. Dorkina, Yu. V. Nikitchenko, Yu. K. Vasilenko

Institute of Biology, State University, Kharkov

As shown by accumulation of malonic dialdehyde and chemiluminescence rate monitoring, tetracycline activated both NADPH- and ascorbate-dependent lipid peroxidation in liver tissue of 1, 3, 12 and 24 months old rats. The most distinct induction of lipid peroxidation was observed in old animals, which appears to occur due to a decrease in efficiency of NADPH-GSH-dependent enzymatic antioxidant system. Silibore prevented the stimulating effect of tetracycline on enzymatic and nonenzymatic lipid peroxidation, being apparently involved in hepatoprotective effect.

УДК 616.633.1:577.152.344.042]-074

*Л. С. Лобарева, Л. В. Платонова, С. Э. Рабинович, М. В. Палулина,
Т. С. Пасхина*

ЭФФЕКТИВНЫЙ СПОСОБ ОДНОВРЕМЕННОГО ИЗВЛЕЧЕНИЯ ИЗ МОЧИ И ОЧИСТКИ ТКАНЕВОГО КАЛЛИКРЕИНА И КИСЛОТОСТАБИЛЬНОГО ИНГИБИТОРА ТРИПСИНА

Институт биологической и медицинской химии АМН СССР, Москва

Известно, что моча человека содержит ряд физиологически активных белков, среди которых присутствуют тканевый калликреин [16] и кислото-стабильный ингибитор трипсина [9, 26].

Калликреин мочи человека (КМЧ) [К.Ф. 3.4.21.35] является биохимическим и иммунологическим эквивалентом тканевых калликреинов, присутствующих в слюнных железах и слюне, панкреатическом соке, секретах предстательной железы и других экскреторных органов [15]. Физиологическая роль и патогенетическое значение тканевых калликреинов как высокоспецифичных кининогеназ и процессинг-протеиназ, участвующих в образовании биологически активных факторов (гормонов, ростовых факторов и др.), в настоящее время интенсивно изучаются [25]. Измерение содержания этих ферментов в биологических жидкостях может быть использовано с диагностическими целями при определенных заболеваниях, например при болезнях почек и гипертонических состояниях [7, 8]. Калликреин мочи необходим как антиген для разработки отечественного диагностикума для радиоиммунологического и иммуноферментного определения тканевых калликреинов.

Ингибитор трипсина мочи (ИТМ) представляет собой продукт ограниченного протеолиза интер- α -ингибито-

ра трипсина плазмы крови, характеризуется широким спектром антипротеазного действия и является мощным противовоспалительным фактором [17]. Он может быть использован в лечении заболеваний, при которых происходит чрезмерная активация протеолитических систем в организме больных. В эксперименте на животных показано лечебное действие ИТМ при бронхиальной патологии [10]. Установлены противошоковый [11], противовирусный [13] и радиозащитный эффекты ИТМ [24]. Получены первые результаты по использованию ИТМ как лекарственного препарата при экспериментальном панкреатите у собак и в условиях плазмасорбции у больных аортоартериитом [4]. ИТМ необходим также как антиген для разработки высокочувствительных методов определения его в моче, что требуется для диагностики некоторых заболеваний почек, например, гломерулонефрита, переходящего в стадию хронической почечной недостаточности [5].

Вышеприведенное свидетельствует о возможности использования КМЧ и ИТМ в практической медицине с диагностическими или лечебными целями и делает необходимой разработку простых препаративных методов выделения фермента и ингибитора из мочи. Известные к настоящему времени способы получения КМЧ и

ИТМ основаны на предварительном концентрировании всех белков мочи с их последующим разделением [9, 16] или на избирательной сорбции КМЧ [21] и ИТМ [3, 22, 26] из мочи. Эти методы являются достаточно трудоемкими, требующими дорогих импортных реактивов и, главное, не позволяющими выделять из мочи оба белка одновременно. Цель настоящей работы заключается в разработке высокоэффективного препаративного метода одновременного выделения из мочи калликрейна и ингибитора трипсина, что представляет собой первый этап на пути их дальнейшей раздельной очистки.

Методика

В работе использовали следующие препараты: трипсин («Srofa», ЧССР), этиловый эфир N-бензоил-L-аргинина (БАЭЭ) («Рсахим», СССР), этиловый эфир N-ацетил-L-фенилаланил-L-аргинина, синтезированный в нашей лаборатории в соответствии с методикой [14, 20], лиофилизированную алкогольдегидрогеназу из дрожжей («Reanal», Венгрия), никотинамидадениндинуклосотид (НАД) («Reanal», Венгрия), трис-(гидроксиметил)-аминометан (Олайнский завод химреактивов, СССР), хитозан (Московский завод химреактивов им. Войкова, ТУ 6-09-05-998—79; СССР), остальные реактивы отечественного производства квалификации х. ч.

Мочу получали от здоровых добровольцев-мужчин в возрасте 30—40 лет.

КМЧ и ИТМ выделяли из мочи по следующей методике. К определенному объему мочи добавляли равный объем водопроводной воды и сухой хитозан из расчета 5—10 г на 1 л мочи. Смесь подкисляли до pH 5,0—6,0 с помощью 2N HCl и перемешивали при комнатной температуре в течение 1—2 ч, затем мочу декантировали, а сорбент тщательно промывали водопроводной водой до полного снижения в промывных водах оптической плотности при 280 нм. Сорбированные на хитозане белки элюировали 1N аммиаком, 2—3 раза обрабатывая сорбент небольшими порциями аммиака прямо в объеме или используя для элюции колонки. Элюаты с pH от 8,0 до 10,0 объединяли и концентрировали на мембране UM-10 фирмы «Амикон». Эта процедура позволяет извлечь КМЧ и ИТМ из мочи практически полностью.

Активность тканевого калликрейна в моче и элюатах с хитозана определяли по скорости гидролиза этилового эфира N-ацетил-L-фенилаланил-L-аргинина. Количество отщепляемого в процессе ферментативной реакции этанола определяли по количеству НАД·Н, образованного из НАД в реакции, сопряженной с окислением этанола в ацетальдегид в присутствии алкогольдегидрогеназы [20]. Активность КМЧ выражали в микромолях субстрата, гидролизуемого ферментом за 1 мин в 0,1 M трис-HCl-буфере pH 8,8—8,9, содержащем 0,15 M семакарбазида, 25 °C.

Активность ИТМ в моче и элюатах с хитозана измеряли по торможению гидролиза эти-

лового эфира N-бензоил-L-аргинина трипсином и выражали в условных ингибиторных единицах (ИЕ) [1]. 1 ИЕ соответствует количеству ингибитора, тормозящему гидролиз трипсином 1 мкмоль субстрата за 1 мин в 0,05 M трис-HCl-буфере pH 8,0, 25 °C.

Содержание белка в моче и элюатах определяли методом [19] после предварительного диализа.

Результаты и обсуждение

В данной работе предложен простой метод одновременного выделения из мочи двух физиологически активных белков — КМЧ и ИТМ. Особенностью метода является использование хитозана как сорбента для извлечения КМЧ и ИТМ из разбавленной мочи при pH 5,0—6,0 и комнатной температуре с последующей элюцией обоих белков 1N аммиаком.

Хитозан является продуктом щелочного гидролиза природного полисахарида — хитина — и довольно широко используется в промышленности и медицине [6]. Хитозан представляет собой полимер из остатков глюкозамина, соединенных β -1→4-связью. Известно использование хитозана как носителя для иммобилизации микроорганизмов [18] и ферментов [27, 28]; применяется он и для очистки некоторых белков, например, лизоцима из куриных яиц [23]. Недавно была показана возможность использования хитозана для очистки калликрейна мочи [12].

В настоящей работе хитозан применяли, учитывая его анионообменные свойства [6], для извлечения из мочи КМЧ и ИТМ — белков, близких по физико-химическим свойствам и, главное, имеющих низкие изоэлектрические точки (ИЭТ) [2, 21]. Нами показано, что полнота сорбции фермента и ингибитора на хитозане зависит от pH мочи, количества добавленного хитозана, времени сорбции, а также от разбавления мочи. На рис. 1 приведены данные по эффективности сорбции КМЧ и ИТМ в зависимости от pH. Как следует из рис. 1, оптимальная зона pH для сорбции фермента и ингибитора 5,0—6,0. В этих условиях оба белка сорбируются на хитозане практически количественно. При более высоких или более низких значениях pH мочи связывание КМЧ и ИТМ с сорбентом снижается. Так, при pH

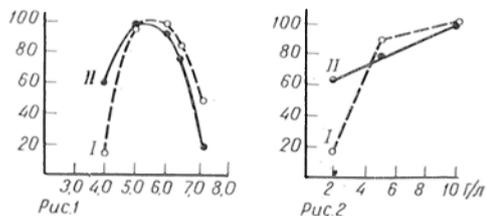


Рис. 1. Зависимость сорбции КМЧ и ИТМ на хитозане от рН мочи.

Здесь и на рис. 2: I — КМЧ, II — ИТМ. По оси абсцисс — рН; по оси ординат здесь и на рис. 2 — сорбция белков, % к исходной величине.

Рис. 2. Зависимость сорбции КМЧ и ИТМ от количества хитозана в 1 л мочи.

По оси абсцисс — количество добавленного хитозана, г на 1 л мочи.

4,0 степень сорбции для фермента 15 %, для ингибитора 50 %; при рН 7,3 для фермента 50 %, для ингибитора 19 %. Очевидно, хитозан как слабый анионообменник связывает в диапазоне рН 5,0—6,0 те белки мочи, которые характеризуются низкими ИЭТ, в том числе КМЧ с ИЭТ 3,5; 3,8; 4,1 [21] и ИТМ с ИЭТ 3,9—4,0 [2]. Следует отметить, что 100 % связывание фермента и ингибитора с хитозаном наблюдается только из мочи, разбавленной водой по крайней мере в 2 раза. Из неразведенной мочи сорбция КМЧ и ИТМ не превышает 50 % от исходного, что, по-видимому, объясняется высокой ионной силой мочи, препятствующей связыванию белков с сорбентом. Оптимальное количественное соотношение хитозана и мочи 5—10 г/л, что обеспечивает 80—100 % сорбцию фермента и ингибитора (рис. 2). При уменьшении количества сорбента до 2 г/л с хитозаном связывается несколько больше половины исходного ИТМ; при этом почти нет сорбции КМЧ. Оптимальная продолжительность сорбции 2 ч. За 1 ч с хитозаном связывается практически весь фермент и примерно 70 % исходного количества ингибитора.

Хитозан сорбирует всего 7—10 % от общего количества белка мочи, а КМЧ и ИТМ связываются с ним практически полностью. Это дает возможность даже в больших препаративных опытах получать 80—90 % выход фермента и ингибитора при 10-кратной очистке обоих компонентов (см. таблицу).

Стадия сорбции КМЧ и ИТМ на хитозане с последующей элюцией 1N

аммиаком и концентрированием элюатов на мембране UM-10 является общей в схеме очистки калликрина и ингибитора трипсина. Далее с помощью аффинных сорбентов (контрикал-сефарозы для КМЧ и химотрипсин-сефарозы для ИТМ) осуществляется раздельная очистка фермента и ингибитора. Хроматография элюата с хитозана на контрикал-сефарозе позволяет отделить КМЧ, связывающийся с сорбентом, от ИТМ, остающегося в растворе. Последующая очистка КМЧ на ДЭАЭ-сефарозе и гель-фильтрация на сефадексе G-100 позволяют получить однородный препарат КМЧ, очищенный в 1050 раз с 35 % выходом (от исходной активности). Хроматография фильтрата, полученного после связывания КМЧ, на химотрипсин-сефарозе с последующим обессоливанием позволяет получить высокоочищенный препарат ингибитора с удельной активностью 66 ИЕ/мг белка и с 70 % выходом от исходной активности.

Таким образом, используя в качестве сорбента хитозан, удается извлечь из мочи почти количественно КМЧ и ИТМ с 10-кратной очисткой каждого компонента. Расход хитозана всего 5—10 г на 1 л мочи, причем использовать его можно многократно, отмывая водой и высушивая. Представляя собой довольно крупные пластинки неправильной формы, хитозан очень быстро оседает, что облегчает работу по отмыванию сорбента и сводит к минимуму потери на этой стадии. Аффинная и ионообменная хроматография в ходе дальнейшей раздельной очистки КМЧ и ИТМ дает возможность получить высокоочищенные препараты фермента и ингибитора с хорошим выходом. Следует также отметить, что хитозан извлекает из мочи гораздо меньше пигмента, чем другие сорбенты, используемые для получения КМЧ и ИТМ, поэтому уже после аффинной хроматографии препараты фермента и ингибитора не окрашены, что заметно облегчает дальнейшую очистку. В известных препаративных способах получения КМЧ с помощью силикагеля [21] и ИТМ с помощью QAE-сефадекса [3] авторы вынуждены для удаления пигмента вводить дополнительную стадию очистки: в первом случае — хроматографию на

Очистка тканевого калликрина и кислотостабильного ингибитора трипсина из мочи с помощью хитозана

Анализируемая проба	Объем, л	Суммарный белок		КМЧ*				ИТМ**			
		мг	%	суммарная активность		удельная активность	очистка	суммарная активность		удельная активность	очистка
				мкмоль/мин	%			ИЕ	%		
						мкмоль/мин/мг белка	кратность			ИЕ/мг белка	кратность
Исходная моча Очищенный препарат (сорбция на хитозане, элюция 1 N аммиаком, концентрирование на мембране UM-10)	100	7759	100	903	100	0,12	1	5400	100	0,7	1
	0,3	555	7	720	80	1,3	10	4800	90	8,7	12

* Активность определяли по гидролизу этилового эфира N-ацетил-L-фенилаланил-L-аргинина.

** Активность определяли по торможению гидролиза этилового эфира N-бензоил-L-аргинина трипсином.

TSK геле G300 SWG, во втором — на полиамиде.

Исследования показали перспективность использования хитозана как дешевого отечественного сорбента для одновременного крупномасштабного получения из мочи двух физиологически активных белков — КМЧ и ИТМ, которые могут быть использованы в практической медицине как для приготовления лекарственных препаратов, так и с диагностическими целями.

ЛИТЕРАТУРА

- Нартикова В. Ф., Пасхина Т. С. // Биохимия. — 1969. — Т. 34, № 2. — С. 282—292.
- Оглоблина О. Г., Галстян Н. А., Карницкий В. В. и др. // Вопр. мед. химии. — 1982. — № 4. — С. 86—93.
- Оглоблина О. Г., Белова Л. А., Малахов В. П. // Там же. — 1987. — № 4. — С. 119—124.
- Оглоблина О. Г., Белова Л. А., Малахов В. П., Парфенкова Г. А. // Бюл. Всесоюз. кардиол. науч. центра. — 1987. — № 1. — С. 40—44.
- Пасхина Т. С., Платонова Л. В., Полянцова Л. Р. // Вопр. мед. химии. — 1988. — № 1. — С. 89—94.
- Плиско Е. А., Нудьга Л. А., Данилов С. П. // Успехи химии. — 1977. — Т. 46. — С. 1470—1487.
- Чернова Н. А., Некрасова А. А. // Кардиология. — 1971. — № 4. — С. 84—88.
- Шхвацабая Н. К., Некрасова А. А., Чернова Н. А., Хухарев В. В. // Тер. арх. — 1973. — № 10. — С. 71—80.
- Bramke V. J., Kueppers F. // Biochem. Med. — 1982. — Vol. 27. — P. 56—60.
- Derwent Jap. patent j. (инexam). — 1981. — N 8. — P. 3. B04.5160724.
- Derwent. Jap. patent j. (инexam). — 1982. — N 40. — P. 12. B04.57140728.
- Europ. Pat. Appl. — N 0098123, C12N 9/64.
- Europ. Pat. Appl. N 0073251. A61K 37/64.
- Fiedler F., Geiger R., Hirschana J., Ley-sath T. // Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. — 1978. — Bd 259. — S. 1667—1673.
- Fiedler F. // Handbook of Experimental Pharmacology. — Berlin, 1979. — Vol. 25, Suppl. — P. 103—161.
- Geiger R., Stuckstedle U., Fritz H. // Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. — 1980. — Bd 361. — S. 1003—1016.
- Jönson B. M., Löffler Ch., Ohlsson K. // Ibid. — 1982. — Bd 363. — S. 1167—1175.
- Klein J., Hechenberg H., Kresseldorf B. // Chem. Abstr. — 1986. — Vol. 104. — N 223508.
- Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., Randall R. J. // J. biol. Chem. — 1951. — Vol. 193. — P. 265—275.
- Offenlegungsschrift BRD N 2.813.772, C07C 103/52.
- Moriuchi S., Sako E., Hapesawa E. et al. // Chem. pharm. Bull. — 1984. — Vol. 32. — P. 1152—1162.
- Muramatsu M., Mori S., Matsuzawa Y. // J. Biochem. — 1980. — Vol. 88. — P. 1317—1329.
- Pat. USA. N 4.552.845, 435—206.
- PCT (Patent Cooperation Treaty) WO 83/0479, A 61K 37/64.
- Schachter M. // Pharmacol. Rev. — 1980. — Vol. 31. — P. 1—17.
- Tanaka Y., Maehara S., Sumi H. et al. // Biochim. biophys. Acta. — 1982. — Vol. 705. — P. 192—199.
- Turkova J. // Chem. Abstr. — 1985. — Vol. 103. — N 1471934.
- Yabe H., Kurahashi J. // Ibid. — 1986. — Vol. 104. — N 1261737.

Поступила 03.02.88

EFFECTIVE PROCEDURE FOR SIMULTANEOUS ISOLATION AND PURIFICATION OF TISSUE KALLIKREIN AND ACID STABLE TRYPSIN INHIBITOR FROM URINE

L. S. Lobareva, L. V. Platonova, S. E. Rabinovich, M. V. Palyulina, T. S. Paskhina

Institute of Biological and Medical Chemistry, Academy of Medical Sciences of the USSR, Moscow

A simple preparative procedure is developed for simultaneous isolation from urine of tissue

kallikrein and acid stable trypsin inhibitor. The procedure involved adsorption of these proteins on chitosan at pH 5-6 and the subsequent elution with 1 N NH_4OH , which enabled to obtain the enzyme and inhibitor with a yield of 80-90% and to purify 10-fold each of these components. Use of chitosan facilitated and simplified distinctly the large scale isolation from urine of the kallikrein and trypsin inhibitor, required for medicinal and diagnostic purposes.

УДК 612.351.1:577.115.3].06:612.592].08

В. А. Терновой, В. М. Яковлев

ВЛИЯНИЕ ПОНИЖЕННЫХ ТЕМПЕРАТУР НА СОСТАВ ЖИРНЫХ КИСЛОТ В ПЛАЗМАЛОГЕННЫХ И ДИАЦИЛЬНЫХ ФОРМАХ ФОСФОЛИПИДОВ В ТКАНИ ПЕЧЕНИ КРЫС

Институт физиологии и экспериментальной патологии высокогорья АН Киргизской ССР, г. Фрунзе

При воздействии различных факторов внешней среды (гипоксия, тепло, холод и др.) и при патологических состояниях (сердечно-сосудистые заболевания, голодание, гепатиты, колиты и др.) в тканях появляются биологически активные метаболиты глицерофосфолипидов — продукты перекисного окисления липидов, простагландины, плазмалогенные формы фосфолипидов [1, 8]. Плазмалогенным формам фосфолипидов отводят некую, пока неясную, роль в формировании адаптивного ответа [2, 3, 5—7]. Возможно, это связано с тем, что плазмалогены повышают стабильность и текучесть мембран, снижают их поверхностный потенциал [1]. Арахидоновая кислота, входящая в структуру плазмалогенов, служит субстратом для синтеза высокоактивных простагландинов, тромбоксанов, непосредственно участвующих в процессе адаптации [1]. Дальнейшее изучение структуры фосфолипидов, а также соотношения в них плазмалогенных и диацильных форм, их жирнокислотного состава, возможно, внесет ясность в понимание функциональной роли плазмалогенов при воздействии на организм различных условий среды.

В данной работе мы изучали жирнокислотный состав плазмалогенных и диацильных форм фосфатидилэтаноламина (ФЭ) и фосфатидилхолина (ФХ) в ткани печени крыс при

акклиматизации к различным пониженным температурам.

Методика

Белые лабораторные крысы-самцы массой 130 ± 10 г были разделены на группы: контрольную, содержавшуюся при 25°C ($n=6$), и подопытные группы, подвергавшиеся 2-недельной экспозиции при 10°C ($n=6$) и 3°C ($n=6$) соответственно. За 1 мес до начала эксперимента и в течение всего времени экспозиции животные получали стандартный сухой корм *ad libitum*. Животных декапитировали. Липиды из ткани печени извлекали по методу [4]. Для разделения диацильной плазмалогенной форм фосфолипидов плазмалогены разрушали парами HCl , а образовавшуюся смесь альдегидов, диацильной и лизо-форм фосфолипидов разделяли методом тонкослойной хроматографии [9]. Жирные кислоты (ЖК) метилировали и анализировали методом газожидкостной хроматографии на фоне средней полярности *Sarbowax 20 M*, при температуре колонок 180°C . Площадь полученных пиков подсчитывали на регистрирующем интеграторе И-02. Полученные пики идентифицировали путем сравнения времен удержания исследованных образцов со стандартными ЖК или по таблицам времен удержания.

Результаты и обсуждение

Из табл. 1 видно, что 2-недельная акклиматизация крыс к 10°C вызвала увеличение доли ненасыщенных ЖК в диацильной форме ФЭ с 43,2 до 72,8% (в процентах к сумме ЖК). Насыщенные и менее ненасыщенные ЖК $\text{C}_{20:0}$ и $\text{C}_{20:2}$, составляющие при 25°C примерно 21%, заменяются при 10°C полиненасыщен-