

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)

В. И. Кухаренко, Е. М. Пичугина, А. А. Дельвиц

СООТНОШЕНИЕ КОЛЛАГЕНА ТИПОВ I И III В ШТАММАХ ФИБРОБЛАСТНЫХ КЛЕТОК ЧЕЛОВЕКА С ДИПЛОИДНЫМ И АНОМАЛЬНЫМ НАБОРОМ ХРОМОСОМ

Институт медицинской генетики АМН СССР, НИИ медицинской энзимологии АМН СССР, Москва

Известно, что фибробластные клетки человека синтезируют коллаген типов I и III. Существует значительное количество наследственных заболеваний человека, которые сопровождаются резким нарушением синтеза коллагена [2, 9, 15], например отмечается резкое снижение синтеза коллагена типа III при синдроме Элерса — Данлоса типа IV, снижение синтеза коллагена типа I при летальной форме несовершенного остеогенеза. Гены коллагена картированы на определенных хромосомах: ген цепи $\alpha_1(I)$ на хромосоме 17, ген цепи $\alpha_2(I)$ на хромосоме 7, ген цепи $\alpha_1(III)$ — на хромосоме 2 [10, 12]. Соотношение синтеза коллагена типов I и III клетками одного штамма является достаточно постоянной величиной и не изменяется в течение значительного числа пассажей [6, 8]. Продукция клетками коллагена типа III может изменяться при высокой плотности клеток, высокой концентрации сыворотки [4, 5, 11], поэтому стабилизация условий эксперимента играет важную роль при изучении соотношения типов коллагена. Ранее было показано, что при исследовании кожи эмбрионов человека доля коллагена типа III может составлять до 50 % всего коллагена, в коже взрослых индивидуумов она может снижаться до 25 % [7]. При обследовании больных с хромосомными синдромами отмечено, что до определенного возраста у детей могут сохраняться некоторые признаки, свойственные эмбрионам (так называемая «персистенция эмбриональных черт»), примером этого признака служит обнаружение эмбрионального типа гемоглобина у детей с трисомией по хромосоме 13. Ранее нами было показано, что в клетках спонтанных абортусов человека с аномальным кариотипом синтез коллагена резко снижен [3]. В связи с этим было интересно выяснить, происходит ли снижение синтеза коллагена в этих штаммах за счет какого-то од-

ного типа коллагена или имеет место пропорциональное снижение синтеза коллагена всех типов, а также установить, изменяется ли соотношение коллагена типов I и III в постнатальных фибробластах по сравнению с эмбриональными в результате изменения их фенотипических свойств или же изменение соотношения коллагена типов I и III в клетках в процессе онтогенеза является результатом регуляторного воздействия на экспрессию коллагеновых генов фибробластов в развивающемся организме.

Методика

В работе использованы штаммы фибробластов человека с диплоидным и aberrантным кариотипом, имеющиеся в специализированной коллекции Института медицинской генетики АМН СССР. Исследовано 5 штаммов, выведенных из материала спонтанных абортусов человека (3 штамма с трисомиями по хромосомам 7 и 9, 2 штамма с триплоидией), 6 диплоидных эмбриональных штаммов (возраст этих штаммов 8—13 нед беременности). Использованы также 4 штамма, выведенные при биопсии кожи больных с синдромом Дауна (трисомия по хромосоме 21) и 3 штамма — от детей с нормальным кариотипом (возраст индивидуумов этой группы 0,5—1,5 года). Также исследованы 4 штамма, полученные при биопсии кожи у здоровых лиц в возрасте 25—30 лет, и 3 штамма — от долгожителей (возраст 81—107 лет). Все исследованные штаммы находились во второй фазе роста. Для культивирования клеток использовалась среда Игла с 5 % сывороткой крупного рогатого скота и 5 % пуповинной сывороткой новорожденных. Коллаген выделяли из культуральной среды штаммов, находившихся в стационарной стадии роста. Клетки рассевали на чашках Петри с плотностью 15 тыс. клеток на 1 см², на 5-й день после субкультивирования вводили аскорбиновую кислоту (50 мкг/мл, «МеГк»), на следующий день питательную среду заменяли бессывороточной средой с [¹⁴C]-пролином (250 мКи/мМ, ЧССР) в дозе 2 мКи/мл и аскорбиновой кислотой (50 мкг/мл) и чашки Петри возвращали на сутки в СО₂-инкубатор. Через сутки культуральную среду собирали, добавляли уксусную кислоту до концентрации 0,5 М, диализовали. Дальнейшая процедура выделения коллагена, условия электрофореза и регистрация данных детально описаны ранее [1]. Полученные данные обработаны с использованием критерия Стьюдента.

Результаты и обсуждение

Результаты определения относительного количества коллагена типа III в культуральной среде исследованных 25 штаммов представлены в таблице. При определении доли коллагена типа III в культуральной среде диплоидных штаммов различного онтогенетического происхождения (эмбрионы, дети, взрослые, долгожители) статистически достоверных различий не получено. Показано также, что наличие в клетках различных хромосомных аномалий (трисомии, триплоидия) не влияет на долю коллагена типа III как в эмбриональных, так и в постнатальных штаммах, следовательно, снижения синтеза коллагена в штаммах спонтанных абортусов человека с аномальным кариотипом за счет коллагена определенного типа не происходит.

Имеются сведения [7, 14] о том, что доля коллагена типа III в некультивируемом биопсийном материале кожи эмбрионов выше, чем в полученной при биопсии коже пациентов различного возраста, однако в нашей работе статистически достоверных различий в уровне коллагена типа III в культивируемых эмбриональных и постнатальных клетках не найдено. Так как известно, что глюкокортикоиды снижают относительное количество коллагена типа III [13, 16], можно предположить, что становление функции надпочечников у плода приводит к снижению доли коллагена типа III у эмбрионов более поздних сроков бере-

Относительное содержание коллагена типа III в культуральной среде диплоидных штаммов и штаммов с аномальным кариотипом ($M \pm m$)

Штаммы	Коллаген типа III, % [α_1 (III)] ₃
Эмбриональные диплоидные	12,7 \pm 1,78 ^a
Постнатальные диплоидные (дети)	10,3 \pm 1,74 ^b
Постнатальные диплоидные (взрослые люди)	9,4 \pm 0,59 ^b
Постнатальные диплоидные (долгожители)	7,0 \pm 2,25 ^г
Эмбриональные с аномальным набором хромосом (трисомии, триплоидия)	13,9 \pm 1,29 ^d
Постнатальные с аномальным набором (трисомия по хромосоме 21)	10,3 \pm 1,93 ^e

Примечание. Различия пар: а—б; а—в; а—г; б—в; б—г; в—г; а—д; б—е; д—е — статистически недостоверны.

менности и у новорожденных. Следовательно, в диплоидных культивируемых фибробластных клетках различного онтогенетического происхождения уровень коллагена типа III значительно не изменяется и этот показатель не может быть использован как маркер культивируемых эмбриональных клеток. На основании имеющихся данных можно констатировать, что резкое изменение соотношения коллагена типов I и III в культивируемых клетках может свидетельствовать о наличии у обследуемых пациентов генной патологии.

ЛИТЕРАТУРА

1. Дельвиц А. А., Кухаренко В. И., Гринберг К. И. и др. // Вopr. мед. химии. — 1983. — № 3. — С. 25—29.
2. Дельвиц А. А. // Там же. — 1986. — № 2. — С. 2—14.
3. Кухаренко В. И., Дельвиц А. А. // Акуш. и гин. — 1986. — № 6. — С. 63—64.
4. Abe S., Stenmann B. U., Wahl L. M. et al. // Nature. — 1979. — Vol. 279. — P. 442—444.
5. Aumailley M., Krieg T., Razaka G. et al. // Europ. J. Cell Biol. — 1980. — Vol. 22. — P. 418.
6. Booth B. A., Polak K. L., Uitto J. // Biochim. biophys. Acta. — 1980. — Vol. 607. — P. 145—160.
7. Epstein E. H. // J. biol. Chem. — 1974. — Vol. 249. — P. 3225—3231.
8. Hance A. J., Crystal R. G. // Nature. — 1977. — Vol. 268. — P. 152—154.
9. Hollister D. W., Byers P. H., Holbrook K. A. // Advanc. hum. Genet. — 1982. — Vol. 12. — P. 1—87.
10. Huerre-Jeanpierre C., Henry I., Mattei M. C. et al. // Cytogenet. Cell Genet. — 1985. — Vol. 40. — P. 657.
11. Narayanan A. S., Page R. C. // FEBS Lett. — 1977. — Vol. 80. — P. 221—224.
12. Relief E., Parker M. I., Relief A. E. // Hum. Genet. — 1985. — Vol. 69. — P. 304—308.
13. Shull S., Cutroneo K. R. // Collagen. Relat. Res. — 1986. — Vol. 6. — P. 295—300.
14. Sykes B., Puddle B., Francis M. et al. // Biochem. biophys. Res. Commun. — 1976. — Vol. 72. — P. 1472—1480.
15. Tsipouras P., Ramirez F. // J. med. Genet. — 1987. — Vol. 24. — P. 2—8.
16. Verbruggen L. A., Abe S. // Biochem. Pharmacol. — 1982. — Vol. 31. — P. 1711—1715.

Поступила 23.05.88

THE RATIO OF COLLAGENS I/III IN HUMAN DIPLOID AND ANOMALOUS FIBROBLAST STRAINS

V. I. Kukharensko, E. M. Pichugina, A. A. Delvig

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

The ratio of collagens I/III was studied in human diploid, trisomic and triploid fibroblast

strains. The following material was used in experiments: 5 strains obtained from human spontaneous abortuses (trisomy 7, trisomy 9, triploidy), 6 diploid embryonic strains, 4 strains from patients with Down syndrome, 3 strains from healthy children, 4 strains from healthy adult donors and 3 strains from very old persons (81-107 years old). Various types of col-

lagen were separated by means of electrophoresis. Distinct ontogenetic alterations were not observed in content of collagen III in diploid and aneuploid human cultivated fibroblasts. However, considerable alterations in the ratio of collagens I/III correlated with genetic pathologies only in the patients examined.

УДК 616.153.1:577.152.344.042.2]-078.333

С.-М. Р. Подярене, М. Н. Лецкене, М. М. Маурицас, Р. Р. Планчюнене

ИММУНОАФФИННАЯ ОЧИСТКА α_1 -ИНГИБИТОРА ПРОТЕАЗ ИЗ ПЛАЗМЫ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА

ЦНИЛ при Каунасском медицинском институте, НПО «Фермент», Вильнюс

α_1 -Антитрипсин, или α_1 -ингибитор протеаз (ИП), является основным ингибитором сериновых протеаз плазмы крови человека. На его долю в норме приходится около 90 % антитрипсиновой активности плазмы крови человека [15]. Содержание ИП в плазме значительно возрастает при воспалительных процессах и стимуляции эстрогенами [3]. Наследственный дефицит ИП у человека сопровождается эмфиземой легких и болезнями печени [16]. Исследование содержания ИП в плазме крови человека имеет большое значение для профилактики и диагностики многих заболеваний. В основе существующих методов определения ИП в плазме крови лежит применение специфических антител против ИП. Однако для получения таких антител необходим иммунохимически чистый антиген — ИП.

В литературе описаны методы [1, 5, 12, 13] очистки ИП из плазмы крови человека, включающие несколько этапов. В настоящей работе мы предлагаем одноэтапный метод аффинной очистки ИП. В основе метода лежит взаимодействие ИП с моноклональными анти-ИП-антителами, ковалентно присоединенными к сефарозе.

Методика

Получение гибридом, синтезирующих моноклональные антитела против ИП, проводили по методу [10]. Результаты этих исследований описаны ранее [2]. Для дальнейшей работы отобрана гибридома НАТ-11, синтезирующая антитела IgG_{2b} класса с легкой цепью κ -типа. Кажущаяся константа связывания НАТ-11 антител с ИП равна $1,48 \cdot 10^{-9}$ М. Титр антител в культуральной среде составлял 1:5120, в асцитической жидкости — 1:2 000 000. Для получения препаративных количеств антител гибридому НАТ-11 выращивали в организме мышей BALB/c в виде асцит-

ной опухоли. Очистку антител из асцитической жидкости проводили методом аффинной хроматографии на протеин-А-сефарозе [9].

Для получения иммуносорбента очищенные НАТ-11 антитела ковалентно присоединяли к бромциан-сефарозе 4В, которую суспендировали в 15 мл 1 М НСl и промывали в течение 15 мин 200 мл того же раствора на стеклянном фильтре. 2 г порошка бромциан-сефарозы 4В при набухании образуют 7 мл геля. 1 г очищенных НАТ-11 антител в 5 мл буфера связывания — 0,1 М NaHCO₃, 0,5 М NaCl (pH 8,3) — смешивали с осадком отмытой сефарозы и инкубировали в течение 2 ч при комнатной температуре. Сорбент отмывали от несвязавшихся антител 200 мл буфера связывания. Полноту отмывки контролировали спектрофотометрически. Отмывку считали завершенной, если оптическая плотность промывной жидкости при 280 нм была меньше 0,01. Свободные активные группы сорбента блокировали, инкубируя сорбент в течение 1 ч в 0,1 М трис-НСl-буфере (pH 8,0). Блокирование проводили при комнатной температуре. Полученный иммуносорбент обрабатывали 3 сменами буфера 1: 0,5 М NaCl, 0,1 М CH₃COONa (pH 4,0) и буфера 2: 0,5 М NaCl, 0,1 М трис-НСl (pH 8,0). Иммуносорбент хранили при 4°C в виде суспензии в забуференном физиологическом растворе (ЗФР): 0,15 М NaCl, 2 мМ KCl, 8 мМ Na₂HPO₄ и 1,5 мМ KH₂PO₄ (pH 7,4), содержащем 0,05 % NaN₃ в качестве консерванта.

Аффинную очистку ИП из плазмы крови человека на полученном иммуносорбенте проводили следующим образом. Колонку с иммуносорбентом уравнивали при 4°C буфером 3: 1,5 М глицина, 3 М NaCl (pH 8,9). Разбавленную в соотношении 1:1 буфером 3 сыворотку крови здоровых доноров наносили на колонку со скоростью 3 мл/ч. Колонку далее промывали буфером 3 до достижения базовой линии показания УФ-детектора. Затем проводили элюцию связавшегося белка с колонки буфером 4—0,1 М лимонной кислоты (pH 3) со скоростью 15 мл/ч. Полученные пикн анализировали против ЗФР и хранили при 4°C до анализа.

Содержание общего белка в исходной сыворотке и во фракциях определяли по методу [4], используя в качестве стандарта сывороточный альбумин человека.

Концентрацию очищенного ИП определяли по поглощению при 280 нм на спектрофото-