

Архив журнала

Вопросы медицинской химии

ISSN 0042-8809

1990

Том 36 выпуск 2

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

1990

Volume 36 issue 2

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>

Характеристика спектров флуоресценции актина, полученного на разных сроках посмертного аутолиза ($\bar{\lambda} + \sigma$)

Время аутолиза, сут	Отношение интенсивности флуоресценции при 320 нм к интенсивности при 365 нм
0	1,54 ± 0,04
1	1,22 ± 0,01
2	1,07 ± 0,07
5	0,98 ± 0,05

ни. Таким образом, по-видимому, основной причиной резкого снижения способности актина к образованию актомиозинового комплекса в посмертном периоде является превращение большей части белка в неактивную, неспособную к полимеризации форму.

Исходя из того что в проведенных экспериментах не были выявлены структурные изменения актина в процессе аутолиза, а его способность к ассоциации с миозином уменьшалась, можно предположить, что белок претерпевает некоторые химические модификации, не приводящие к деструкции биополимера. Известно, что в процессе аутолиза происходят различные физико-химические процессы в мышечной ткани: изменение pH, накопление SH-групп, увеличение активности протеолитических ферментов и т. д. [15, 16]. Эти процессы, по-видимому, могут приводить к модификациям белка, изменению центра полимеризации актина, которые сказываются на его способности к полимеризации и образованию актомиозинового комплекса. Следует отметить, что в ряде модельных экспериментов, проведенных на G-актине при инкубации его с препаратами плазматических мембран печени, также показано значительное снижение способности белка к полимеризации с сохранением его структурной целостности [10].

В заключение необходимо подчеркнуть, что выбранные в проведенном исследовании сроки аутолиза не захватывали так называемый период трупного окоченения, наблюдаемый обычно от 12 до 24 ч после смерти [1] и характеризующийся целым рядом особенностей, в частности значительным усилением ассоциации актина и миозина [20]. Изменения актина в этот период, по-видимому, могут отличаться от описанных в данной работе и нуждаются в дальнейшем изучении.

ЛИТЕРАТУРА

1. Лушников Е. Ф., Шапиро Н. А. Аутолиз.— М., 1974.
2. Никитина З. К., Ребров Л. Б. // Вопр. мед. химии.— 1988.— № 6.— С. 76—81.
3. Пантелеева И. С. Миозин (O¹⁸-обмен и фосфорилирование).— Л., 1975.— С. 75—78.
4. Хайтлина С. Ю., Гусев Е. В., Пинаев Г. П. и др. // Биофизика и биохимия мышечного сокращения.— М., 1976.— С. 119—124.
5. Хайтлина С. Ю. // Биофизические и биохимические методы исследования мышечных белков.— Л., 1978.— С. 122—141.
6. Черногрядская Н. А., Рязанов Ю. М., Богданова М. С., Боровиков Ю. С. Ультрафиолетовая флуоресценция клетки.— Л., 1978.
7. Шелудько Н. С. // Цитология.— 1975.— Т. 17, № 10.— С. 1148—1154.
8. Axen R., Ernback S. // Europ. J. Biochem.— 1971.— Vol. 18, N 2.— P. 351—359.

9. Bradford M. M. // Analyt. Biochem.— 1976.— Vol. 72, N 2.— P. 248—254.
10. Cruda J., Pollenda J. M., Therien H. M. // Canad. J. Biochem.— 1983.— Vol. 61, N 2—3.— P. 85—92.
11. David H., David S. // Acta biol. med. germ.— 1965.— Bd 14.— S. 247—251.
12. Frehette G., Dube J. Y., Tremblay R. R. // Int. J. Biochem.— 1986.— Vol. 18, N 8.— P. 697—703.
13. Greene L. E., Selleys J. R., Eisenberg E. et al. // Biochemistry (Wash.).— 1983.— Vol. 22, N 3.— P. 530—535.
14. Hirabayashi T., Hayashi Y. // Develop. Growth Different.— 1970.— Vol. 12, N 1.— P. 89—95.
15. Komukai M., Kobayashi K. J., Horiuchi S. // Comp. Biochem. Physiol.— 1986.— Vol. 85, N 1.— P. 55—59.
16. Lister D., Spenser G.-S. G. // Metab. Sci.— 1983.— Vol. 8, N 1.— P. 41—51.
17. Murakami U., Uchida K. // J. Biochem. (Tokyo).— 1985.— Vol. 98, N 1.— P. 187—197.
18. Nichikawa A. H., Bailon P., Ramel A. H. // J. Makromol. Sci. Chem.— 1976.— Vol. A10, N 1—2.— P. 149—190.
19. Seki N., Watanabe T. // Bull. Jap. Soc. Sci. Fich.— 1982.— Vol. 48, N 4.— P. 517—524.
20. Takahashi K., Nakamura F., Inoue A. // J. Biochem. (Tokyo).— 1981.— Vol. 89, N 1.— P. 321—324.

Поступила 08.02.89

ALTERATIONS IN ACTIN OF RAT SKELETAL MUSCLES DURING POSTMORTEM AUTOLYSIS

Z. K. Nikitina, N. N. Abrosimenkova, L. B. Rebrov

Research Laboratory of Biological Structures, Ministry of Public Health of the USSR, Moscow.

Electrophoretic analysis of actin, obtained within 1,2 and 5 days after death, did not exhibit any destructions of the protein. At the same time, an ability of actin to develop the actomyosin complex was decreased during autolysis as shown by affinity chromatography of actin on CNBr-Sepharose containing immobilized myosin. Alterations in fluorescence spectra of the actin preparations enabled to suggest that an increase of inactive, unable to polymerization form of the protein during autolysis was responsible for reduction of its property to associate with myosin.

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 1990

УДК 616-056.3-092.9-07:616.36-008.931:577.152.34

Г. Ю. Мальцев, В. В. Кржечковская, И. Н. Марокко, М. М. Ганпаров

ОБНОВЛЕНИЕ ГЕМОПРОТЕИНОВ ПЕЧЕНИ МОРСКИХ СВИНОК С РАЗЛИЧНОЙ УСТОЙЧИВОСТЬЮ К ГЕКСЕНАЛУ ПРИ ПЕРОРАЛЬНОЙ СЕНСИБИЛИЗАЦИИ

Институт питания АМН СССР, Москва

Одной из биохимических закономерностей развития экспериментальных реакций гиперчувствительности является вовлечение в процесс сенсibilизации микросомальных и митохондриальных гемопротеинов печени морских свинок [10, 13, 18]. При этом обнаружен реципрокный характер взаимосвязи между состоянием активности системы микросомальных монооксигеназ печени и выраженностью реакций гиперчувствительности немедленного и замедленного типа у животных различных видов [2, 4, 10—12]. Так, в частности, при исследовании критерия длительности гексабарбиталового сна, широко применяемого для оценки активности микросомальных монооксигеназ in vivo [1, 9, 23], было выявлено достоверное усиление тяжести пищевой анафилаксии у морских свинок с длительной продолжительностью сна по сравнению с животными, устойчивыми к гексеналу

Распределение морских свинок по длительности гексеналового сна и выраженности пищевой анафилаксии к ОВА после сенсибилизации

Показатель	Продолжительность гексеналового сна, мин			
	0	1—20	21—40	41—60
Число животных	99	167	196	64
Состав животных в группах, %	18,8	31,8*	37,2*	12,2
Летальность от шока, %	24,0	59,6*	90,3*	87,5*

Примечание. Звездочка — достоверность статистического различия по угловому преобразованию Фишера по сравнению с животными с НС.

[12]. Принимая во внимание тот факт, что скорость обновления ферментов в организме играет важную роль в его адаптации к внешним воздействиям [5, 14], в настоящей работе предпринята попытка выявить взаимосвязь между длительностью гексеналового сна и интенсивностью обновления митохондриальных и микросомальных цитохромов.

Методика

Исследования выполнены на беспородных морских свинок-самцах с исходной массой тела 250—300 г, содержащихся на стандартном рационе вивария. Устойчивость к гексеналу оценивали за 1 нед до сенсибилизации путем внутривенного введения гексенала в дозе 30 мг/кг. Продолжительность гексеналового сна определяли с момента утраты рефлекса переворачивания до его восстановления.

Пищевую сенсибилизацию и анафилаксию к куриному овальбумину — ОВА (пятикратно перекристаллизованному, производства Олайнского НИО «Биохимреактив») вызывали, как описано ранее [17]. Интенсивность пищевой анафилаксии оценивали по уровню летальности. Содержание цитохромов и скорость их обновления исследовали через 7 дней после введения ОВА. В гомогенате печени определяли содержание цитохрома Р-450 [21] и b_5 [22]. Содержание цитохромов а, с (c_1), b в митохондриях определяли в системе аэрированных митохондрий — восстановленные дитионитом натрия митохондрии с использованием двухлучевого спектрофотометра «Спекорд» (ГДР). В расчетах использовали коэффициенты пересчета, приведенные в работе [8]. Радиоактивность в полученных после дифференциального центрифугирования фракциях, а также в гомогенате определяли после осаждения их 10 % охлажденной ТХУ, последовательной отмывки осадков 5 % ТХУ и смесью эфир — этанол (3:1), растворения осадков в 0,1 н. NaOH. В растворенных пробах определяли белок [20] и радиоактивность в сцинтилляционной смеси толуол — тритон (2:1) на счетчике «Ракбэт» (фирма ЛКБ, Швеция) с коррекцией на гашение. Обновление цитохромов оценивали по кинетике включения 5-амино-4- $[^{14}C]$ -левулиновой кислоты (АЛ) с удельной радиоактивностью 55 нКи/ммоль (фирма «Амершам», Великобритания), введенной в дозе 3,3 мКи на животное. Радиоактивность выражали в распадах в минуту (dpm) на 1 г массы печени соответственно в осаждаемой и неосаждаемой фракциях. Ввиду колебаний массы навесок после промывок физиологическим раствором эти величины были скорректированы путем умножения фактической массы навески в граммах на величину отношения среднего содержания белка в 1 г печени в группе к индивидуальному содержанию белка в данной навеске. Расчет скорости обновления был модифицирован: вместо классического уравнения расчета [24]:

$$k = \frac{P(t_2) - P(t_1)}{[F(t) \cdot dt] - [P(t) \cdot dt]}, \quad (1)$$

где k — коэффициент обновления, $F(t)$ и $P(t)$ — соответственно свободная и связанная специфические радиоактивности, было использовано уравнение:

$$k = \frac{a \cdot t^b}{F_0 \cdot t \cdot P}, \quad (2)$$

где a — dpm/г и b — параметры степенной регрессии, F_0 — исходная удельная радиоактивность предшественника (АЛ), dpm/ммоль АЛ, t — время, P — содержание цитохромов, ммоль/г. Кривые включения АЛ обрабатывали с помощью регрессионного анализа с вычислением доверительных зон [3]. Для проверки статистических гипотез о достоверности различий использовали непараметрические критерии: Манна — Уитни [15] и углового преобразования Фишера [6].

Результаты и обсуждение

Распределение интактных морских свинок по длительности гексеналового сна (табл. 1) показало, что популяции животных, устойчивых к действию гексенала («нулевой сон» — НС) и чувствительных к гексеналу (продолжительность сна более 40 мин), практически равны между собой, но значительно отличаются от процентного содержа-

ния животных с длительностью гексеналового сна от 1 до 40 мин.

Выявленная гетерогенность популяции животных по критерию длительности гексеналового сна дала основание для выбора 2 полярных групп животных: с НС и «длительным сном» (ДС), представительство которых в популяции оказалось равным, но чувствительность к пищевой анафилаксии резко различалась и была достоверно выше у животных с ДС.

Содержание цитохромов Р-450 и b_5 в микросомальной фракции и величина суммы митохондриальных цитохромов приведены в табл. 2. Как видно, достоверным является различие в содержании цитохромов Р-450 и b_5 в группе с НС по сравнению с другими группами. Кинетика включения $[^{14}C]$ -аминолевулиновой кислоты в осаждаемые ТХУ фракции, а также в неосаждаемые фракции при расчете на 1 г массы печени приведена на рисунке. Обращает на себя внимание, что кривые выведения — включения АЛ перекрещиваются рано, причем включение в осаждаемые фракции происходит и после перекреста. Это свидетельствует о быстром связывании АЛ в промежуточном пуле, экстрагируемом смесью эфир — этанол. Это предположение подтверждается близким к линейному характеру включения АЛ. Указанное обстоятельство делает невозможным расчет скорости обновления цитохромов по классическому способу, требующему учета кривой радиоактивности в пуле непосредственного предшественника.

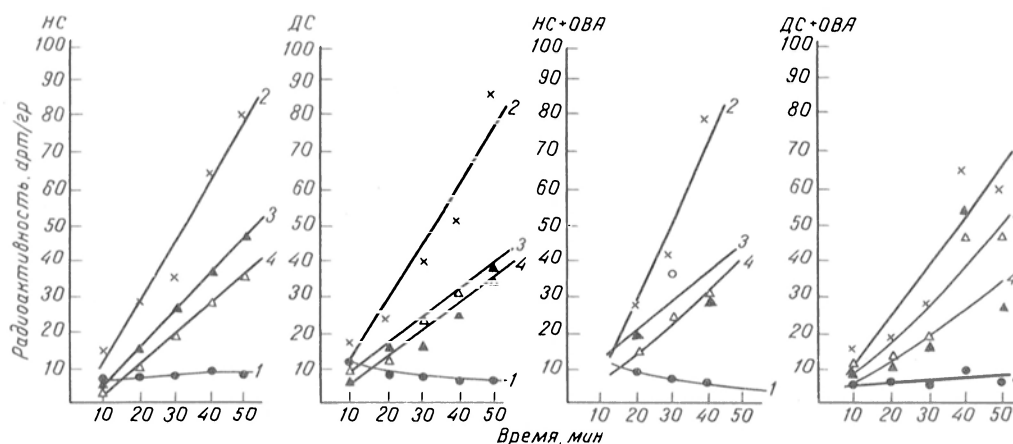
Выход может быть предложен в замене функции кривой выведения из пула предшественника постоянной во времени величиной, численно рав-

Таблица 2

Содержание цитохромов микросом и митохондрий у морских свинок с различной продолжительностью гексеналового сна при пероральной сенсибилизации (X; $n=5$)

Группа животных	Цитохромы, ммоль белка на 1 г		
	Р-450	b_5	$a+c (c_1 + b_{\text{днт}})$
НС	23,7	22,7	87,2
НС+ОВА	39,4*	28,9*	98,2
ДС	41,8*	30,3*	100,1
ДС+ОВА	37,3*	30,0*	87,2

Примечание. Звездочка — достоверные различия по критерию Манна — Уитни в сравнении с группой НС.



Динамика включения $[^{14}\text{C}]$ - аминокислот в фракции печени морских свинок.

1 — свободная радиоактивность; 2 — общая радиоактивность гомогената; 3 — микросомальная и 4 — митохондриальная фракции.

ной исходной удельной радиоактивности, умноженной на время $F_0 \cdot t$. Ввиду очень высокой удельной радиоактивности предшественника (АЛ) величиной интеграла под кривой включения — см. формулу (1) — при этом можно пренебречь. Кроме того, при использовании регрессионного анализа кривых включения АЛ установлено, что наилучшей аппроксимацией является степенная функция типа $a \cdot t^b$ — см. формулу (2), что в значительной степени повышает точность вычисления величины числителя в уравнении расчета и соответственно скоростей обновления цитохромов.

Скорости обновления, выраженные в наномолях АЛ на 1 г печени в сутки (а) и относительные коэффициенты обновления в наномолях АЛ на 1 нмоль гема (б) представлены в табл. 3.

Общая скорость обновления гемопротеинов гомогената в первых 3 группах складывается в основном из скоростей обновления гемопротеинов микросомальной и митохондриальной фракций. Обращает на себя внимание резкое увеличение скорости обновления гемопротеинов гомогената печени сенсibilизированных ОВА животных с ДС. Надежно установленным фактом является то, что коэффициент скорости обновления в группе животных с ДС почти вдвое ниже, чем у животных с НС во фракции микросом, в то время как в митохондриальной фракции достоверных изменений между группами не отмечается. Таким образом, снижение уровня цитохромов Р-450 и b_5 у животных с НС связано с их повышенной обновляемостью, в то время как снижение коэффициента обновления у животных с ДС может способствовать накоплению цитохромов Р-450 и b_5 . Это в свою очередь определяет замедление ме-

таболизма гексенала и снижение устойчивости к сенсibilизации у морских свинок с ДС. Можно предположить, что цитохромные системы микросом к действию снотворных и сенсibilизирующих веществ могут адаптироваться при относительно постоянстве скорости потока обновления за счет вариации обновляемости и содержания цитохромов.

В группах сенсibilизированных животных заключений о достоверности не удастся сделать из-за широких доверительных интервалов, вызванных нелинейным характером включения АЛ, хотя по средним значениям отмечается тенденция к усилению обновления.

Значение темпов обновления белков для защиты организма от аллергенных воздействий подтверждается данными, отражающими антианафилактический эффект глюкагона [19], стимулирующего обновление белков у эукариотов [7], и усиление реакций гиперчувствительности немедленного и замедленного типа под влиянием инсулина [16]. Сопоставление приведенных фактов с результатами настоящей работы свидетельствует о физиологической важности параметра обновляемости микросомальных гемопротеинов в адаптации организма к неблагоприятным внешним воздействиям [5], в том числе к сенсibilизации модельным пищевым белком.

ЛИТЕРАТУРА

1. Авакумов В. М., Ковлер М. А. // Фармакол. и токсикол. — 1980. — № 4. — С. 417—421.
2. Акимов В. Г., Омелченко О. Г. // Вестн. дерматол. — 1987. — № 3. — С. 4—6.
3. Афифи А., Эйзен С. Статистический анализ: Подход с использованием ЭВМ: Пер. с англ. — М., 1982.

Таблица 3

Скорости обновления гемопротеинов печени морских свинок с различной устойчивостью к гексеналу при пероральной сенсibilизации ($\bar{X} \pm \Delta^*$, $n=5$)

Группа животных	Общая фракция		Микросомальная фракция		Митохондриальная фракция	
	а	б	а	б	а	б
НС	$17,2 \pm 2,9$	$0,128 \pm 0,022$	$9,0 \pm 0,5$	$0,193 \pm 0,010$	$6,9 \pm 0,9$	$0,079 \pm 0,009$
НС+ОВА	$18,4 \pm 5,2$	$0,111 \pm 0,030$	$10,7 \pm 8,0$	$0,156 \pm 0,118$	$8,8 \pm 1,3$	$0,090 \pm 0,013$
ДС	$16,9 \pm 3,7$	$0,098 \pm 0,021$	$7,1 \pm 1,8$	$0,098 \pm 0,025^{**}$	$8,7 \pm 1,0$	$0,086 \pm 0,010$
ДС+ОВА	$56,7 \pm 21,0$	$0,366 \pm 0,138$	$7,4 \pm 5,4$	$0,111 \pm 0,079$	$9,9 \pm 4,4$	$0,114 \pm 0,050$

Примечание. Одна звездочка — доверительный интервал, вычисленный из доверительного интервала регрессии $t_{(n-2, 1-\frac{\alpha}{2})} \cdot \frac{S}{\sqrt{n}}$, где α — 5 % уровень значимости, t — критерий Стьюдента, S — оценка остаточной дисперсии. Две — $p < 0,05$ относительно группы животных с НС; а и б — см. объяснение в тексте.

4. Вольский Н. Н., Цырлова И. Г., Козлов В. А. // Иммунология.— 1985.— № 3.— С. 47—49.
5. Гаппаров М. М. // Вестн. АМН СССР.— 1986.— № 11.— С. 22—28.
6. Гублер Е. В. Вычислительные методы анализа и распознавания патологических процессов.— М., 1978.— С. 84—86.
7. Дин Р. Процессы распада в клетке: Пер. с англ.— М., 1981.— С. 107—116.
8. Евтодченко Ю. В., Мохова Е. Н. // Механизм дыхания, фотосинтеза и фиксации азота.— М., 1967.— С. 35—48.
9. Ковалев И. Е., Борисова Л. П. // Журн. микробиол.— 1981.— № 4.— С. 42—46.
10. Ковалев И. Е., Пирязян Л. А., Шатерников В. А. // Докл. АН СССР.— 1982.— Т. 266.— С. 247—249.
11. Ковалев И. Е., Хлопушина Т. Г., Марокко И. Н. и др. // Пат. физиол.— 1983.— № 4.— С. 22—25.
12. Марокко И. Н., Хлопушина Т. Г., Лысенкова Е. М. и др. // Бюл. eksper. биол.— 1984.— № 12.— С. 713—715.
13. Плешкова С. М. // Там же.— 1978.— № 10.— С. 467—470.
14. Покровский А. А. Роль биохимии в развитии науки о питании.— М., 1974.
15. Полард Дж. Справочник по вычислительным методам статистики: Пер. с англ.— М., 1982.— С. 171—174.
16. Пыцкий В. И., Андрианова Н. В., Артамасова А. В. Аллергические заболевания.— М., 1984.— С. 70—72.
17. Садыкова Р. Е., Марокко И. Н., Мазо В. К. и др. // Вопр. питания.— 1987.— № 1.— С. 43—45.
18. Федоров И. И. // Аллергия в клинике и эксперименте.— Киев, 1968.— С. 5—13.
19. Andielkovic I., Zlokovic B. // Brit. J. Pharmacol.— 1982.— Vol. 76.— P. 483—489.
20. Hartree E. // Analyt. Biochim.— 1972.— Vol. 48.— P. 422—427.
21. McLean A., Day P. // Biochem. Pharmacol.— 1974.— Vol. 23.— P. 1173—1180.
22. Omuro T., Sato R. // J. biol. Chem.— 1964.— Vol. 239.— P. 2379—2385.
23. Staneva-Stocheva D., Tancheva L. // Acta physiol. pharmacol. bulg.— 1978.— Vol. 4.— P. 36—42.
24. Zilversmit D. B. // Amer. J. Med.— 1960.— Vol. 29.— P. 832—848.

Поступила 24.03.89

TURNOVER OF LIVER HEMOPROTEINS IN GUINEA PIGS WITH VARIOUS RESISTANCE TO HEXENAL AFTER PER OS SENSITIZATION

G. Yu. Maltsev, V. V. Krzhechkovskaya, I. N. Marocco, M. M. Gapparov

Institute of Nutrition, Academy of Medical Sciences of the USSR, Moscow.

Patterns of hemoproteins turnover were studied in microsomal and mitochondrial fractions of liver tissue of guinea pigs with various duration of hexenal sleep; these patterns were calculated by means of modified procedure involving incorporation of ¹⁴C-aminolevulinic acid. Increase in turnover of microsomal cytochromes corresponded to decrease of their content in animals with short-term sleep simultaneously with a decrease in the lethal index after sensitization by means of ovalbumin.

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 1990

УДК 615.361.13.03:616.13-089.844].012.1.074

Г. А. Реброва, Ю. А. Ромаков, Ю. И. Денисов-Никольский, А. П. Михалев

ХАРАКТЕРИСТИКА ЭЛАСТИНА СТЕНКИ КРУПНЫХ АРТЕРИЙ ЧЕЛОВЕКА ПРИ ОБРАБОТКЕ ФОРМАЛЬДЕГИДОМ

НИИ биологических структур Минздрава СССР

С развитием сосудистой хирургии необходимо дальнейшее совершенствование материалов, используемых для пластики артерий различного диаметра [3]. Несмотря на то что к настоящему

времени созданы заменители сосудов из полимерных материалов [4], изготовление артериальных ксенотрансплантатов путем специальной обработки артерий крупных животных продолжает привлекать внимание специалистов [1—3]. Такая обработка включает фиксацию растворами формальдегида или глутарового альдегида, а также применение протеолитических ферментов, расщепляющих неколлагеновые белки сосудистой стенки. В результате получается коллагеноэластический ксеиотрансплантат с минимальными антигенными свойствами и гладкой внутренней поверхностью [3, 4]. Изучение биомеханических характеристик таких трансплантатов [1] показало, что предварительная 2-часовая обработка трипсином не снижает прочностных свойств их стенки по сравнению с контролем.

Нами установлено, что обработка фрагментов крупных артериальных сосудов формальдегидом значительно повышает устойчивость фибриллярных белков (прежде всего коллагена) к действию специфических и неспецифических протеаз. При этом происходят изменения в структуре кислорастворимой и нерастворимой фракций коллагена, делающие белок стабильным и устойчивым к протеолиту [5, 6].

Целью настоящего исследования явилась биохимическая оценка состояния эластина стенки крупных артерий при фиксации.

Методика

Объектом исследования служил эластин, выделенный из дуги аорты человека (возраст 20—40 лет) методом Лапсина [19]. О чистоте выделенного белка судили по данным аминокислотного анализа, проведенного на аминокислотном анализаторе фирмы LKB (модель 3201), и по количеству оксипролина [23].

Образцы эластина обрабатывали 0,5, 4,0 и 8,0 % растворами формальдегида (рН 7,5) в течение 1, 2, 7, 14, 42 сут. После этого определяли устойчивость эластина к действию следующих протеаз: панкреатической эластазы (КФ 3.4.21.11), пепсина (КФ 3.4.23.1), трипсина (КФ 3.4.21.4) и проназы.

Условия ферментного гидролиза: 10 мг эластина, 0,3 мг эластазы (проназы, пепсина и трипсина — 1 мг), 3 мл 0,15 М боратного буфера (рН 8,8) для эластазы, трис-буфер (рН 7,6) для пепсина и трипсина и 0,1 М СН₃СООН (рН 3,4) для проназы, температура — 37 °С. Контролями служили: проба, не содержащая фермента, и проба, содержащая фермент без субстрата. После окончания протеолиза нерастворимый белок удаляли из инкубационной смеси и в ней определяли продукты гидролиза по реакции с нингидрином [10]. Величину протеолиза эластина выражали в процентах от общего содержания NH₂-групп в образцах после их полного щелочного гидролиза [16].

В отдельных экспериментах определяли степень расщепления эластина смесью 0,1 н. КОН в присутствии 80 % этанола [18].

Количество связанного с эластином формальдегида определяли, обрабатывая образцы 0,5, 4,0 и 8,0 % [¹⁴C]-формальдегидом в течение 1, 7 и 14 сут. Для удаления свободного и лабильно связанного формальдегида образцы промывали боратным буфером (рН 8,8), ежедневно меняя его в течение 5 сут.

Продукты гидролиза эластина протеазами определяли методом гель-фильтрации на колонках с гелем марки TSK-gel Toouperl HW-55. В качестве элюирующего раствора использовали боратный буфер (рН 8,8) или 0,5 М СН₃СООН. Маркерами при калибровке колонки служили следующие соединения: ферритин (м. м. 480 кД), миоглобин (м. м. 45 кД), сывороточный альбумин (м. м. 67 кД), цитохром (6,5 кД), А-цепь инсулина (2,5 кД). Выход УФ-поглощающего материала с колонки регистрировали при длине волны 278 нм. Одновременно во фракциях (по 1 мл), которые собирали на коллекторе, определяли содержание [¹⁴C]-метки.

В отдельных экспериментах состояние эластиновых структур сосудистой стенки контролировали морфологически, применяя метод трансмиссионной электронной микроскопии.