

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>

Н. Г. Гелинг

МЕТОДИЧЕСКИЕ ПОДХОДЫ ПРИ ОЦЕНКЕ ОБРАЗОВАНИЯ ПРОСТАГЛАНДИНОВ ИЗОЛИРОВАННЫМИ ТРОМБОЦИТАМИ ЧЕЛОВЕКА

ВНИИ общей и судебной психиатрии им. В. П. Сербского, Москва

Удобной моделью для изучения патологических процессов могут служить тромбоциты (ТЦ) и, в частности их способность к биосинтезу простагландинов (ПГ). Известно активное образование в изолированных ТЦ человека одного из ПГ — тромбоксана B_2 (TXB_2) при диабете, осложненном инфаркте миокарда и в период активной фазы стенокардии [7, 10]. Представляет интерес и изучение активности ПГ-синтетазы в ТЦ человека при психических заболеваниях, поскольку ТЦ по ряду биохимических параметров могут рассматриваться как периферическая модель, отражающая состояние центральных нейронов [19].

Анализ данных литературы и полученных нами результатов предварительных исследований позволил выбрать не только оптимальные методические подходы при оценке активности ПГ-синтетазы, но и повысить их точность, чувствительность и воспроизводимость. Добиться этого удалось за счет получения устойчивых к процедурам выделения ТЦ, сохранения их целостности, повышения активности ПГ-синтетазы и эффективности разделения образующихся ПГ.

Результаты и обсуждение

Метод оценки активности ПГ-синтетазы включает следующие этапы: 1) получение изолированных ТЦ; 2) инкубация меченых предшественников синтеза ПГ с суспензией отмывых ТЦ; 3) выделение и очистка образующихся ПГ; 4) количественный анализ активности ПГ-синтетазы. *Получение изолированных ТЦ.*

Определенные свойства ТЦ тесно связаны с их функцией в гемостазе, что в свою очередь создает трудности при их выделении и изучении. Существуют различные способы получения изолированных ТЦ, подробно описанные в обзоре Gerrard [4], — гель-фильтрация, отмывка ТЦ с использованием ЭДТА, альбумина или цитратного буфера. Недостатком большинства из них являются активация ТЦ и изменение их ультраструктуры в процессе выделения [8, 12]. При использовании гель-фильтрации наблюдаются вызванная АДФ реакция высвобождения и значительные изменения функциональной активности ТЦ [6]. Отмывка ТЦ с ЭДТА способствует образованию псевдоподий и функционально менее активных ТЦ [2]. За счет сильного сродства к Ca и Mg, помимо хелатирования их из среды, ЭДТА может способствовать выходу этих катионов из мембраны, приводя в некоторых случаях к необратимому поражению ТЦ [4]. Применение альбумина также нежелательно, так как он связывает значительные количества жирных кислот и особенно жирных кислот, являющихся субстратами ПГ-синтетазы [16, 18].

Radomski и Moncada [11] предложили применять при выделении ТЦ простациклин. Эта модификация дает суспензию стабильных ТЦ с сохранением в течение длительного времени высокой реакционной активности к агонистам и ингибиторам. Однако при оценке активности ПГ-синтетазы, по-видимому, нежелателен контакт ТЦ с экзогенным простагланцином, так как это может привести к сенсibilизации ПГ-синтезирующего фермента и снижению образования ПГ.

Наиболее оптимальной при оценке активности ПГ-синтетазы в ТЦ является цитратная отмывка, дающая морфологически неизменные и функционально активные ТЦ [4].

В настоящей работе ТЦ получали по модифицированному методу Lagarde и соавт. [8]. Кровь отбирали в пластиковые пробирки, содержащие цитратный буфер pH 4,5 (85 mM цитрат натрия, 65 mM лимонная кислота, 58 mM декстроза) в отношении 9:1 по объему. Для удаления эритроцитов и лейкоцитов кровь центрифугировали в течение 10 мин при 200 g. Плазму, обогащенную ТЦ, подкисляли до pH 6,5 охлажденным 0,15 M раствором лимонной кислоты, что снижало их реакционную активность и делало их более устойчивыми к процедурам выделения. После осаждения в течение 10 мин при 1 000 g осадок ТЦ ресуспендировали в модифицированном Тироде-Хенес буфере pH 6,5 — безкальциевом буфере, содержащем 0,35 % БСА, 50 ед/мл гепарина и 0,05 мг/мл апираза. Такой состав отмывочного буфера является наиболее оптимальным для сохранения целостности ТЦ и снижения их реактивности и, кроме этого, облегчает последующее ресуспендирование и повышает эффективность выделения ТЦ [4]. Так, отсутствие в буфере кальция устраняет возможность образования фибрина, альбумин препятствует лизису ТЦ, гепарин предотвращает проявление агрегационной активности образующегося тромбина, а апираза способствует расщеплению АДФ, выделяемого ТЦ в ходе их выделения и отмывки. Повторно ТЦ осаждали в течение 10 мин при 800 g и осадок ТЦ ресуспендировали в безкальциевом Тироде-Хенес буфере pH 7,4. Для восстановления функциональной активности ТЦ их использовали для синтеза ПГ через 1 ч после получения конечной суспензии.

Инкубация меченых предшественников синтеза ПГ с отмывыми ТЦ.

Для оценки активности ПГ-синтезирующего фермента были использованы меченные по углероду арахидоновая ($[^{14}C]$ -АК) и дигомо-гамма-линоленовая ($[^{14}C]$ -ДГЛК) кислоты с удельной радиоактивностью 54,9 мКи/ммоль. Изолированные ТЦ ($2 \cdot 10^8$ на 1 мл) в течение 10 мин инкубировали с $[^{14}C]$ -АК или $[^{14}C]$ -ДГЛК (конечная концентрация 5 мкМ) в 50 mM трис-HCl pH 7,4, уравновешенном физиологическим раствором, при перемешивании и температуре 37 °C. В качестве контроля проводили инкубацию $[^{14}C]$ — жирных кислот в отсутствии ТЦ. Для доказательства ферментного образования ПГ может быть использована ацетилсалициловая кислота как ингибитор циклооксигеназы. Как видно из

Таблица 1

Влияние ацетилсалициловой кислоты и соотношения субстрат/фермент на активность ПГ-синтетазы ТЦ при инкубации с [¹⁴C]-АК

Условия инкубации			Образование ПГ, нмоль на 10 ⁹ ТЦ		
[¹⁴ C]-АК, мкМ	ТЦ, 10 ⁸ /мл	ацетилсалициловая кислота, мМ	ТХВ ₂	ПГЕ ₂	ПГФ _{2α}
5,0	2,0	0,0	1,44	0,33	0,07
5,0	2,0	1,0	0,04	0,06	0,04
5,0	4,0	0,0	1,00	0,10	0,04
2,5	2,0	0,0	1,10	0,13	0,04

табл. 1, преинкубация ТЦ с 1 мМ раствором ацетилсалициловой кислоты в 0,05 М фосфатном буфере pH 7,4 в течение 2 мин приводила к 94 % ингибированию активности всего комплекса ПГ-синтетазы с максимальным подавлением образования ТХВ₂ (97 %) и минимальным — ПГФ_{2α} (45 %). Следует отметить, что первичный продукт метаболизма АК в ТЦ — ТХА₂, но он очень быстро превращается в неактивный, но стабильный ТХВ₂, который, как правило, и используется в качестве внутреннего стандарта при оценке активности ПГ-синтезирующего фермента. Сопоставляя выбранные нами условия инкубации с имеющимися в литературе, можно сказать, что другие исследователи могли использовать концентрацию АК в 2 раза большую [7] или 5 раз меньшую [1], а также значительно (до 10·10⁸) увеличивать количество ТЦ [7]. Однако именно выбранные нами условия инкубации были оптимальными для работы ПГ-синтезирующего комплекса. Дальнейшее увеличение концентрации субстрата нежелательно, так как в отсутствии альбумина концентрация АК уже в 20 мкМ способна вызвать лизис ТЦ [4]. Кроме того, как видно из табл. 1, 2-кратное уменьшение соотношения субстрат / фермент за счет увеличения количества ТЦ или уменьшения концентрации [¹⁴C]-АК приводило к подавлению активности ПГ-синтезирующего фермента. Аналогичные результаты были получены и при инкубации изолированных ТЦ с [¹⁴C]-ДГЛК.

Помимо выбора оптимального соотношения субстрат / фермент, активность ПГ-синтетазы, а следовательно и чувствительность метода, могут быть повышены за счет активации синтеза ПГ при барбитурации карбогеном [1]. Однако насыщение инкубационной среды карбогеном также нежелательно, так как способствует неконтролируемому и неферментному окислению жирных кислот. Это в свою очередь приводит к появлению ложной радиоактивности в хроматографических зонах, соответствующих анализируемым ПГ (см. табл. 2), и таким образом снижает не только точность метода, но также его воспроизводимость и специфичность.

Продолжительность инкубации (10 мин) была выбрана нами в соответствии с кинетикой протекания реакции, когда «выход на плато» образования ПГ отмечается через 10 мин инкубации ТЦ с субстратом [15]. То же самое относится и к

Таблица 2

Неферментное окисление [¹⁴C]-АК под влиянием насыщения инкубационной среды карбогеном (в отсутствии ТЦ)

Условия инкубации	Радиоактивность (dpm) в зонах хроматографической пластинки, соответствующих ПГ			
	ТХВ ₂	ПГЕ ₂	ПГФ _{2α}	ПГД ₂
Карбоген	346	306	369	257
Без карбогена	101	77	55	101

pH инкубационной среды 7,4, которое, как установлено Такаута и соавт. [15], является оптимальным для максимальной активности циклооксигеназы.

Следует обратить внимание на тот факт, что необходимо проводить очистку [¹⁴C]-АК или [¹⁴C]-ДГЛК, поскольку перекиси, образующиеся при хранении ненасыщенных жирных кислот, оказывают влияние на образование ПГ [9]. Кроме этого, при длительном хранении возникает опасность радиолиза меченных радиоактивными изотопами соединений, а при использовании [³H]-АК происходит окисление [³H], что приводит к образованию воды и возможности загрязнения хроматографических пластинок. В этой связи проводили очистку меченого субстрата на колонке, заполненной силикагелем (100—200 меш). Жирные кислоты количественно элюировали хлороформом, тогда как перекисные соединения, как более полярные, оставались на сорбенте.

Выделение и очистка образующихся ПГ.

Экстракцию образующихся в инкубационной среде ПГ проводили по методу Stenson и Lobos [13]. К реакционной среде добавляли охлажденную на льду смесь хлороформа, метанола и 1 % муравьиной кислоты в соотношении 1,2:1,2:0,1 по объему. После экстракции хлороформенную фазу концентрировали под азотом. Перед последующим разделением ПГ методом ТСХ желательно избавиться от непрореагировавшего субстрата хроматографией на колонке с силикагелем. При этом [¹⁴C]-жирные кислоты элюировали хлороформом, а их метаболиты — 20 % метанолом в хлороформе. Целесообразность проведения этой дополнительной очистки связана с тем, что при ТСХ непрореагировавшие жирные кислоты мигрируют с фронтом растворителя, оставляя за собой хвост радиоактивности. С учетом того, что согласно полученным данным в реакцию не вступает 60—70 % от добавленного субстрата, а приблизительно 20—30 % поглощается ТЦ и около 10 % метаболизируется ферментативно, очевидно, что может произойти значительное фоновое загрязнение хроматографической пластинки мечеными жирными кислотами.

На следующем этапе метаболиты жирных кислот разделяли ТСХ (см. рисунок). На покрытые силикагелем хроматографические пластинки «Silufol» (150×150 мм, ЧССР) наносили сконцентрированный под азотом элюат колоночной хроматографии совместно со стандартными растворами АК и ее метаболитов (по 10 мкг) — ПГВ₂, ПГД₂, ПГЕ₂, ПГФ_{2α}, 12-гидрокси-5, 8, 10,

Разделение ПГ методом ТСХ.

ТСХ осуществляли в системе *а* — диэтиловый эфир: метанол:ледяная уксусная кислота в соотношении 90:1:2 или в системе *б* — бензол: эфир:этанол:ледяная уксусная кислота в соотношении 50:40:2:0,2.

<i>а</i>	<i>б</i>
ПГД ₂ ● НЕТЕ	● АК
ТХВ ₂ ●	● ГЭТК
ПГЕ ₂ ●	● ПГВ ₂
ПГФ _{2α} ●	● ПГД ₂
	● ПГЕ ₂ , ТХВ ₂

14-эйкозатетраеновую кислоту (ТЭТК). В выбранных условиях проведения ТСХ ПГ как 1-й, так и 2-й серий имеют одинаковые хроматографические характеристики, и те же самые стандарты могут быть использованы для оценки метаболизма как АК, так и ДГЛК. Трехкратная ТСХ в системе диэтиловый эфир: метанол: ледяная уксусная кислота в соотношении 90:1:2 [3] дает хорошее разделение ТХВ₂ ($R_f=0,64$), ПГЕ₂ ($R_f=0,33$) и ПГФ_{2α} ($R_f=0,23$). В этой системе ПГД₂ и ГЭТК совпадают по R_f , поэтому при оценке образования ПГД₂, а также при анализе липооксигеназной активности ТЦ следует применять систему, предложенную Stenson и Parker [14], — бензол: эфир: этанол: ледяная уксусная кислота в соотношении 50:40:2:0,2, дающую разделение ПГД₂ ($R_f=0,17$), ПГВ₂ ($R_f=0,34$), ННТ ($R_f=0,55$), ГЭТК ($R_f=0,61$) и АК ($R_f=0,72$), тогда как ТХВ₂, ПГЕ₂ и ПГФ_{2α} остаются практически на старте. Пятна, соответствующие стандартным ПГ, проявляли в парах йода и после экстракции метанолом просчитывали радиоактивность на сцинтилляционном счетчике.

Ввиду разнообразия методов экстракции и последующего хроматографического разделения ПГ мы не проводили в этом разделе их сравнительную характеристику. Наш выбор прежде всего был обусловлен простотой и эффективностью экстракции, а также наилучшим разделением образующихся в ТЦ ПГ методом ТСХ. Что касается колоночной хроматографии, то этот этап был введен нами как дополнительный, по причине, изложенной выше. Хотя, как впоследствии нами было установлено для ТХВ₂ (но не для других ПГ), отделение продуктов реакции колоночной хроматографией не имеет существенного значения, так как активность фермента в этом случае определяется с многократным превышением фоновых значений.

Количественный анализ активности ПГ-синтетазы.

Активность ПГ-синтетазы оценивали по количеству ПГ (в нмоль), синтезируемых ТЦ из меченого субстрата за 10 мин инкубации в расчете на определенное количество ТЦ (10^9). После соответствующего пересчета идентифицированной на хроматографической пластинке радиоактивности в активность ПГ-синтетазы получили следующие данные, представленные в табл. 3.

Таким образом, изолированные ТЦ синтезируют из АК главным образом ТХВ₂. На его долю в среднем приходилось 85 % от общей активности циклооксигеназы, что согласуется с дан-

Таблица 3

Превращение экзогенной АК или ДГЛК (5 мкМ) в ПГ изолированными ТЦ человека

Субстрат	Нмоль ПГ на 10^9 ТЦ ($M \pm m$)
АК	ТХВ ₂ — $1,35 \pm 0,09$, $n=9$
АК	ПГЕ ₂ — $0,15 \pm 0,09$, $n=9$
АК	ПГФ _{2α} — $0,08 \pm 0,01$, $n=9$
АК	ПГЕ ₂ /ТХВ ₂ — $0,11 \pm 0,07$, $n=9$
ДГЛК	ТХВ ₂ — $0,19 \pm 0,03$, $n=4$
ДГЛК	ПГЕ ₂ — $0,27 \pm 0,03$, $n=4$
ДГЛК	ПГФ _{2α} — $0,09 \pm 0,02$, $n=4$
ДГЛК	ПГЕ ₂ /ТХВ ₂ — $1,42 \pm 0,27$, $n=4$

ными литературы [17]. Помимо ТХВ₂, обнаружены незначительные количества ПГЕ₂ и ПГФ_{2α}. Суммарный синтез ПГ 1-й серии из ДГЛК (ПГЕ₂, ПГФ_{2α}, ТХВ₂) примерно в 3 раза меньше по сравнению с ПГ 2-й серии, образующимися из АК (ПГЕ₂, ПГФ_{2α}, ТХВ₂). Учитывая, что количество ДГЛК в фосфолипидах мембран обычно в 15—30 раз меньше количества АК [5], можно предположить, что в условиях *in vivo* вклад ПГ 1-й серии гораздо меньше по сравнению с ПГ 2-й серии. Однако ПГЕ₂ в отличие от ПГЕ₂ имеет выраженный антиагрегационный эффект, а ТХВ₂ по сравнению с ТХВ₂ — меньшую агрегационную активность. И если принять во внимание 13-кратное повышение соотношения ПГЕ₂/ТХВ₂ по сравнению с соотношением ПГЕ₂/ТХВ₂, то становится очевидным, что не только ПГ 2-й серии, но и ПГ, образующиеся из ДГЛК, в определенных ситуациях могут иметь большое значение для функциональной активности ТЦ.

Предлагаемый нами метод был использован для оценки активности ПГ-синтетазы в ТЦ больных шизофренией. При этом выявлено изменение образования ПГ и главным образом ТХВ₂. Так, в соответствии с результатами клинической картины заболевания у больных в стадии обострения обнаружено повышенное образование ТХВ₂ ($2,32 \pm 0,11$ нмоль на 10^9 ТЦ, $n=8$) по сравнению со здоровыми людьми ($1,35 \pm 0,09$ нмоль на 10^9 ТЦ, $n=9$, $p<0,01$).

В заключение следует еще раз подчеркнуть, что предлагаемые методические подходы, такие, как получение интактных и функционально активных ТЦ, подбор оптимальных условий для работы ПГ-синтезирующего фермента, очистка от загрязнения вводимого в реакционную смесь субстрата и эффективное разделение образующихся ПГ, позволяют повысить точность, чувствительность и специфичность методов, которые были использованы другими авторами.

ЛИТЕРАТУРА

1. Задкова Г. Ф., Марков Х. М. // Вопр. питания.— 1987.— № 4.— С. 56—60.
2. Akkerman J. W. N., Doucet-de-Bruine M. H. M., Gorter G. et al. // Thrombos. Haemostas.— 1978.— Vol. 39.— P. 146—151.
3. Bailey J. M., Bryant R. W., Feinmark S. J., Makheja A. H. // Prostaglandins.— 1977.— Vol. 13.— P. 479—492.
4. Gerrard J. M. // Meth. Enzymol.— 1982.— Vol. 86.— P. 642—654.
5. Horrobin D. F., Manku M. S. // Brit. med. J.— 1980.— Vol. 280.— P. 1363—1366.
6. Kaplan K. L., Danzner M. J., Rose S. // Blood.— 1981.— Vol. 58.— P. 797—802.

7. Lagarde M., Berciand P., Burlin M. et al. // Prostaglandins, Prostacyclin, and Thromboxanes Measurement.— Hague, 1980.— P. 182—188.
8. Lagarde M., Bryon P. A., Guichardant M., Dechavanne M. // Thrombos. Res.— 1980.— Vol. 17.— P. 581—588.
9. Moncada S. // Arteriosclerosis.— 1982.— Vol. 2.— P. 193—207.
10. Neriserneri G. G. // Lancet.— 1984.— Vol. 2.— P. 838—841.
11. Radomski M., Moncada S. // Thrombos. Res.— 1983.— Vol. 30.— P. 383—389.
12. Snyder E. L., Koerner T. A., Hezzey A. // Vox Sang.— 1982.— Vol. 43.— P. 71—75.
13. Stenson W. F., Lobos E. // Biochem. Pharmacol.— 1983.— Vol. 32.— P. 2205—2209.
14. Stenson W. F., Parker C. W. // J. clin. Invest.— 1979.— Vol. 64.— P. 1457—1465.
15. Takayama H., Okuma M., Uchino H. // Thrombos. Haemost.— 1980.— Vol. 44.— P. 111—114.
16. Yoshida A., Aoki N. // Blood.— 1978.— Vol. 52.— P. 969—977.
17. Velardo B., Lagarde M. // Biochem. biophys. Res. Commun.— 1985.— Vol. 130.— P. 1109—1114.
18. White H. L., Glassman A. T. // Prostaglandins.— 1976.— Vol. 12.— P. 811—817.
19. Wood K., Coppen A. // Progress in Enzymology.— Stuttgart, 1982.— P. 147—162.

Поступила 31.01.89

APPROACHES TO EVALUATION OF PROSTAGLANDIN FORMATION BY SEPARATE HUMAN PLATELETS

N. G. Geling

All-Union Institute of General and Forensic Psychiatry, Moscow.

Individual steps of prostaglandin-synthetase activity evaluation in human platelets are considered in detail, involving isolation of platelets, incubation of washed cells with labelled arachidonic or dihomog- γ -linolenic acids, extraction of prostaglandins from incubation medium and their separation as well as quantitative estimation of the prostaglandins developed (nmoles/10⁹ platelets / 10 min). The methodical approaches suggested enabled not only to avoid some errors during estimation of the prostaglandin-synthetase activity in individual platelets but also to increase accuracy, sensitivity and specificity of the procedure as compared with similar methods.

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 1990

УДК 616.153.937-008.61-07:616.153.962.3-073.537

Ю. И. Миллер, Э. Г. Юшко, Г. Е. Добрецов, Б. М. Красовицкий, Р. К. Айдыралиев

ФЛЮОРЕСЦЕНТНЫЙ МЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ АЛЬБУМИНА В СЫВОРОТКЕ КРОВИ ПРИ ГИПЕРБИЛИРУБИНЕМИИ

Тульская областная больница; НИИ физико-химической медицины Минздрава РСФСР, Москва; НПО «Монокристалл-реактив», Харьков

Для определения альбумина в сыворотке (плазме) крови можно использовать флюоресцентный метод [1, 9]. Его достоинства — гораздо более высокая чувствительность по сравнению с любым другим способом, быстрота и простота анализа. Но при многих заболеваниях в сыворотке крови повышается концентрация низкомолекулярных веществ, которые сорбируются альбумином, что в свою очередь влияет на связывание флюоресцентного зонда [5]. Так, при гипербилирубинемии (это наиболее яркий пример патологического повышения концентрации эндогенного лиганда) получают искаженные значения концентрации сывороточного альбу-

мина человека (САЧ), измеренной по интенсивности флюоресценции зонда N-фенил-1-амино-8-сульфонафталина [10]. Мы предлагаем другой флюоресцентный зонд 9, 10-дианилино-2-сульфоантрацен и такие условия измерения, при которых можно определять концентрацию САЧ у больных желтухой.

Методика

Использовали флюоресцентные зонды N-фенил-1-амино-8-сульфонафталин (АНС) фирмы «Serva» (ФРГ) и 9,10-дианилино-2-сульфоантрацен (К-33). К-33 получали нагреванием смеси натриевой соли антрахинон-2-сульфокислоты, анилина, хлорида алюминия и цинковой пыли с последующим подкислением продукта реакции соляной кислотой. После кристаллизации из водного диметилформамида получали порошок желто-оранжевого цвета с температурой плавления выше 300 °С. Максимум спектра поглощения К-33 в этаноле при 430 нм. В растворе белка максимум спектра возбуждения флюоресценции при 433 нм, а спектра флюоресценции при 545 нм. АНС растворяли в этаноле в концентрации 4 мМ, К-33 — в диметилформамиде в концентрации 1 мМ. Интенсивность флюоресценции измеряли на флуориметре медицинском ФМ-Ц-2 размером 1 см² в кювете. Флюоресценцию АНС возбуждали при 360 нм, регистрировали при 450 нм; соответственно К-33 при 420 и 550 нм. Оптическую плотность растворов измеряли на спектрофотометре СФ-26 в 1 см в кювете.

Сыворотку крови для флюоресцентных измерений разводили одним из буферных растворов: а) 0,01 М ацетат натрия pH 4,0 и б) 0,01 М трис-HCl pH 7,4. Билирубин лиофилизированный («Merck», ФРГ) растворяли в диметилформамиде до концентрации 300—400 мкМ и добавляли в микроколичествах к разведенным пробам сыворотки.

Сыворотку крови делили на 2 фракции: альбумины и глобулины путем осаждения последних полиэтиленгликолем-3000 («Merck», ФРГ) [7]. Глобулины затем ресуспендировали соответствующим буфером. Определение количества альбумина в сыворотке крови проводили унифицированным методом с использованием абсорбционного красителя бромкрезолового зеленого в присутствии детергента бридж-35 («Sigma», США) в кислой среде [3, 4].

Сравнивали измеренные разными способами значения концентрации САЧ в 30 пробах сыворотки крови, из которых 21 была с повышенным содержанием билирубина (от 28 до 326 мкМ), 5 — с цифрами креатинина от 202 до 966 мкМ (уремия) и 5 сывороток — с нормальными биохимическими показателями. Кроме того, исследовали 4 сыворотки с концентрацией общего билирубина от 338 до 493 мкМ. Гипербилирубинемия и уремия различного генеза. Статистическую обработку проводили на ЭВМ «Искра-226» по стандартным программам.

Результаты и обсуждение

Флюоресцентный зонд К-33 — гидрофобная молекула, заряженная отрицательно за счет сульфогруппы. Как известно, органические анионы обладают повышенным сродством к сывороточному альбумину [8], т. е. вполне возможно, что К-33 в сыворотке крови будет связываться преимущественно с альбумином. Чтобы это доказать, разделили 4 сыворотки на альбумины и глобулины. Добавляли избыточные по отношению к белку (предварительно протитровав зондом) количества К-33, чтобы свести к минимуму переход молекул зонда от одной белковой фракции к другой. Интенсивность флюоресценции К-33 в сыворотке в 100—150 раз больше, чем в буферном растворе. Измеряли интенсивность флюоресценции зонда во фракции альбуминов, затем в эту же пробу добавляли глобулин. Оказалось, что глобулины увеличивают флюоресценцию К-33 всего лишь на 5±2 %. Интенсивность флюоресценции К-33 в растворе изолированных глобулинов составляет 13±5 % от его флюоресценции