

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>

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. Nerisneri 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 dihomo- $\gamma$ -linolenic acids, extraction of prostaglandins from incubation medium and their separation as well as quantitative estimation of the prostaglandins developed (nmoles/10<sup>9</sup> 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

Тулская 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 «Serwa» (ФРГ) и 9,10-дианилино-2-сульфоантрацен (К-33). К-33 получали нагреванием смеси натривой 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 см<sup>2</sup> 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 рН 4,0 и б) 0,01 М трис-НСl рН 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

в цельной сыворотке. Это можно объяснить тем, что глобулины гораздо хуже связывают К-33, чем альбумины. Другое возможное объяснение — меньший квантовый выход флуоресценции К-33 в комплексе с глобулинами. Но так или иначе 95 % флуоресценции К-33 в сыворотке крови за счет связанной с альбумином фракции зонда.

Измерению концентрации САЧ с помощью флуоресцентного зонда в желтой сыворотке препятствует билирубин [10], который поглощает свет в области 450 нм. Тем не менее, при используемом нами разведении сыворотки в 400 раз потери флуоресцентного света за счет поглощения его билирубином будут небольшими (менее 7 %) при самой массивной гипербилирубинемии. Второе, и это гораздо важнее, — неконъюгированный билирубин связывается с альбумином, что мешает связыванию АНС. Насколько такое влияние существенно можно определить в модельном опыте по титрованию зондом нормальной сыворотки (разведение в 200 раз), к которой добавлен лиофилизированный билирубин (рис. 1). Увеличение концентрации водородных ионов изменяет сродство заряженных флуоресцентных зондов к альбумину [2, 11] и влияет на центр связывания билирубина молекулы САЧ, в формировании которого участвуют аргининовые и гистидиновые остатки [6]. Оказалось, что билирубин практически не влияет на флуоресценцию АНС при pH 4,0, в то время как при pH 7,4 билирубин «тушит» АНС на 20 %. Что касается сыворотки крови больного желтухой, то «тушение» флуоресценции АНС связано не только с билирубином, но и, видимо, с каким-то другим фактором, связанным с патологией печени. Причем его влияние на флуоресценцию АНС можно снизить при переходе от pH 7,4 к 4,0, но не удастся убрать совсем. На флуоресценцию К-33 при pH 4,0 (см. рис. 1) билирубин также не оказывает влияния. В то же время замена АНС на К-33 улучшает ситуацию с сывороткой больного — разница между кривыми 2 и 3 уменьшается в 2 раза.

Казалось бы, можно было работать при низких концентрациях АНС или К-33 при pH 4,0, где кривые 1, 2 и 3 совпадают (см. рис. 1). Но при таком соотношении зонд / альбумин (примерно 1:1) не будет достаточного количества зонда для заполнения всех мест связывания на альбумине, и калибровочная кривая даже при физиологических колебаниях САЧ не будет линейной.

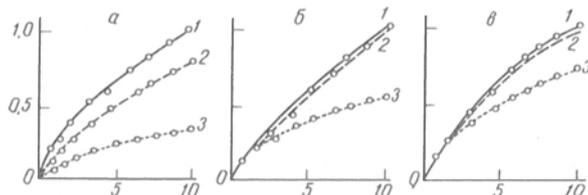


Рис. 1. Флуоресцентное титрование различных проб сыворотки.

По оси абсцисс — концентрация флуоресцентного зонда (в мкМ); по оси ординат — интенсивность флуоресценции (в усл. ед.). а — зонд АНС pH 7,4; б — зонд АНС pH 4,0; в — зонд К-33 pH 4,0. 1 — сыворотка с нормальным содержанием билирубина; 2 — то же, но с добавлением 1 мкМ лиофилизированного билирубина, что соответствует 200 мкМ непрямого (связанного с альбумином) билирубина в неразведенной сыворотке; 3 — сыворотка больного желтухой, общий билирубин 326 мкМ, не прямой 86 мкМ. Разведение сывороток 1:200. Данные выравнены по концентрации САЧ.

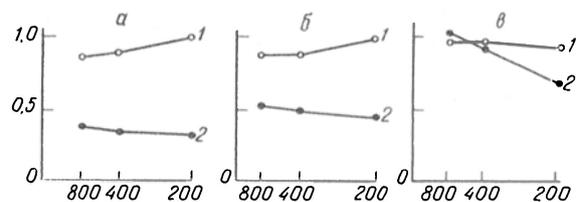


Рис. 2. Зависимость удельной флуоресценции зондов в разных пробах от разведения сыворотки.

По оси абсцисс — разведения сыворотки; по оси ординат — отношение интенсивности флуоресценции зондов к концентрации САЧ в растворе, определенной унифицированным методом.

а — 40 мкМ АНС pH 7,4; б — 40 мкМ АНС pH 4,0; в — 15 мкМ К-33 pH 4,0. 1 — сыворотка с нормальным содержанием билирубина; 2 — сыворотка больного желтухой, общий билирубин 326 мкМ.

Таким образом, путем изменения pH среды и замены зонда АНС на К-33 удалось нивелировать влияние билирубина и уменьшить влияние других ингибиторов связывания, которые присутствуют в сыворотке крови при печеночной недостаточности. Эти ингибиторы могут быть либо обратимыми, либо необратимыми. В первом случае на комплексообразование зонда с САЧ будет влиять степень разведения раствора, т. е. другими словами концентрация конкурентного ингибитора. На рис. 2 представлены результаты эксперимента, который показывает преимущество К-33 перед АНС. При степени разведения 1:400—1:800 интенсивность флуоресценции зонда К-33 при pH 4,0 дает истинное содержание САЧ в сыворотке больных желтухой. В случае же АНС ни с помощью pH, ни разведением не удастся полностью избавиться от влияния ингибиторов связывания.

Чтобы убедиться в эффективности и преимуществах метода с использованием К-33, мы провели определение альбумина в 30 пробах сыворотки (разведение 1:400) с различным содержанием билирубина и креатинина следующими способами: по старой методике — с АНС pH 7,4 [1], по предлагаемой нами — с К-33 (pH 4,0) и с помощью бромкрезолового зеленого [4] (рис. 3).

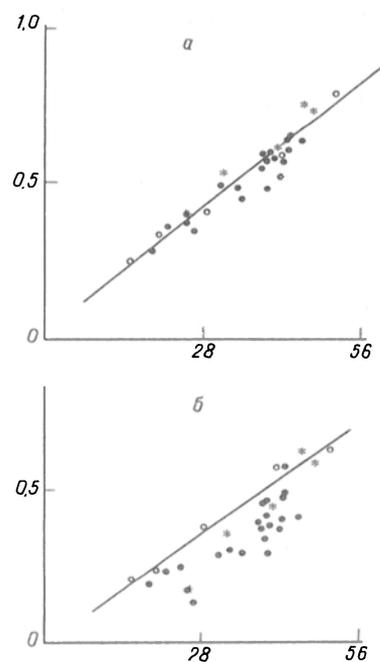


Рис. 3. Интенсивность флуоресценции зондов в разных пробах сыворотки при различной концентрации альбумина.

По оси абсцисс — концентрация альбумина (в г/л), определенная унифицированным методом; по оси ординат — интенсивность флуоресценции (в усл. ед.). а — 20 мкМ АНС pH 7,4. Разведение сывороток 1:400. Светлые кружки: сыворотки с нормальными биохимическими показателями; темные: сыворотки с общим билирубином от 28 до 326 мкМ, звездочки — сыворотки с креатинином от 202 до 966 мкМ. Прямые построены по точкам, соответствующим нормальным сывороткам.

Последний метод был контрольным, он рекомендован как унифицированный [3] и дает хорошую корреляцию с электрофоретическим определением альбумина: 0,91 по данным литературы [4] и 0,94 ( $n=33$ ) по нашим данным. Коэффициент корреляции для пары К-33 — бромкрезоловый зеленый составляет 0,955, а для пары АНС — бромкрезоловый зеленый 0,844. Видно, что в сыворотках с высоким уровнем билирубина АНС дает заниженные результаты, и степень «тушения» не коррелирует с концентрацией билирубина. Напротив, К-33 можно использовать для определения САЧ в сыворотке с любым содержанием билирубина. При чрезвычайно массивной желтухе (4 больных с общим билирубином сыворотки от 338 до 493 мкМ) рекомендуется развести сыворотку в 800 раз, а результат умножить на 2. Подобная процедура при использовании АНС все равно дает существенно заниженные результаты. Кстати сказать, повышенный креатинин (до 966 мкМ) также не влияет на связывание К-33 с САЧ.

Если построить калибровочную кривую по точкам, которые соответствуют сывороткам с нормальными биохимическими показателями, то можно рассчитать ошибку измерения по флюоресценции количества альбумина в группе патологических сывороток. Для К-33 средняя ошибка не превышает 3 %, тогда как для АНС она составляет 21 %.

Методически предлагаемый метод чрезвычайно прост. К 4 мл ацетатного буфера (0,01 М, рН 4,0), содержащего 15 мкМ К-33, добавляют 10 мкл сыворотки и измеряют интенсивность флюоресценции. К-33 достаточно стоек в растворе диметилформамида, но быстро гидролизует в воде. Поэтому лучше использовать 1 мМ раствор зонда в диметилформамиде, не допуская попадания в него воды, а перед употреблением готовить рабочий раствор в ацетатном буфере.

В заключение нужно подчеркнуть, что предлагаемый флюоресцентный метод определения альбумина обладает рядом преимуществ. Он несравнимо проще и быстрее электрофореза в любой модификации, технологичен, может быть автоматизирован. По сравнению с унифицированным методом не требуется импортного реактива бридж-35. К тому же чувствительность флюоресцентного определения на порядок выше, чем при измерении оптической плотности красителя.

Флюоресцентный зонд К-33, как и АНС, может быть использован для определения количества альбумина в сыворотке крови. Использование зонда К-33 (разведение сыворотки 1:400 рН 4,0) дает возможность измерять концентрацию сывороточного альбумина при гипербилирубинемии и уремии, тогда как интенсивность флюоресценции АНС «тушится» в сыворотке крови больных желтухой 3. Предлагаемый метод прост, обладает рядом преимуществ перед другими способами определения альбумина и может быть использован в клинико-лабораторной практике.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Айдыралиев Р. К., Добрецов Г. Е., Белевич Г. В. и др. // Лаб. дело. — 1987. — № 6. — С. 450—454.
2. Бат-Эрдэнэ О. Влияние среды на функциональные и

структурные свойства сывороточного альбумина человека: Автореф. дис. ... канд. биол. наук. — Минск, 1985.

3. Лабораторные методы исследования в клинике: Справочник / Под ред. В. В. Меньшикова. — М., 1987. — С. 174—178.
4. Об унификации клинических лабораторных методов исследования. (Приказ МЗ СССР от 21 ноября 1979). — М., 1981.
5. Birkell D. J., Wanwimolruk S. // Protein Binding Drug Transp. — 1986. — Vol. 20. — P. 11—27.
6. Fenske K. J., Muller W. E., Wollert U. // Biochem. Pharmacol. — 1981. — Vol. 30, N 7. — P. 687—692.
7. Ingham K. S. // Arch. Biochem. — 1987. — Vol. 186. — P. 106—113.
8. Klotz I., Burkhardt R., Urquhart J. // J. Amer. chem. Soc. — 1952. — Vol. 74, N 1. — P. 202—208.
9. Laurene D. J. R. // Biochem. J. — 1952. — Vol. 51, N 2. — P. 168—180.
10. Rees V. N., Fildes J. E., Laurence D. J. R. // J. clin. Path. — 1954. — Vol. 7, N 4. — P. 336—340.
11. Seki T., Akimoto T., Lijima T. // Colloid. Polimer. Sci. — 1987. — Vol. 265, N 2. — P. 148—154.

Поступила 21.06.88

#### ESTIMATION OF BLOOD SERUM ALBUMIN IN HYPERBILIRUBINEMIA USING A FLUORESCENT PROCEDURE

Yu. I. Miller, E. G. Yushko, G. E. Dobretsov, B. M. Krasovitsky, R. K. Aidyrallyev

Regional Hospital, Tula, Institute of Physico-Chemical Medicine, Ministry of Public Health of the RSFSR, Moscow, Scientific-Industrial Association "Monocrystal Reagent", Kharkov.

A procedure is developed for estimation of human blood serum albumin in hyperbilirubinemia using a fluorescent probe 9,10-dianiline-2-sulfoanthracene (K-33). Use of the probe N-phenyl-1-amino-8-sulfonylphthalene (ANS) led to underestimation of albumin in hyperbilirubinemia as bilirubin and other inhibitors prevented the ANS binding with blood serum albumin. Substitution of ANS for K-33 enabled to estimate the albumin concentration under conditions of the pathology accompanied by an increase of endogenous ligands content in blood serum. The rate of K-33 (15 mM) fluorescence in blood serum (diluted 400-fold, at pH 4.0) correlated with albumin concentration ( $r=0.955$ ).

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 1990

УДК 616-008.931:577.152.11-074:543.42.062

В. А. Костюк, А. И. Потапович, Ж. В. Ковалева

#### ПРОСТОЙ И ЧУВСТВИТЕЛЬНЫЙ МЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ АКТИВНОСТИ СУПЕРОКСИД-ДИСМУТАЗЫ, ОСНОВАННЫЙ НА РЕАКЦИИ ОКИСЛЕНИЯ КВЕРЦЕТИНА

Белорусский государственный университет им. В. И. Ленина, Минск

Супероксиддисмутаза (СОД; КФ 1.15.1.1) является ключевым ферментом антиокислительных систем всех аэробных организмов, катализирующим превращение анион-радикала кислорода ( $O_2^-$ ) в перекись водорода и молекулярный кислород [4]. Прямое определение активности фермента требует весьма сложного оборудования, отсутствующего в большинстве биохимических лабораторий и медицинских учреждений. Вместе с тем активность СОД является одним из наиболее часто определяемых показателей в различных экспериментальных и клинических исследованиях. В этих случаях используют непрямые методы анализа, основанные на торможении СОД реакций, протекающих с участием  $O_2^-$ . В настоя-