

Архив журнала

## Вопросы медицинской химии

*ISSN 0042-8809*

1989 том 35 выпуск 3

**Внимание!** Распознавание текста проведено в автоматическом режиме для облегчения работы поисковых систем. Будьте внимательны при копировании, возможны ошибки и неточности.

## Voprosy meditsinskoï khimii

The journal archive

*ISSN 0042-8809*

1989 volume 35 issue 3

**Attention!** OCR has been performed automatically for search engines only. Be careful when copying, errors are possible.

<http://pbmc.ibmc.msk.ru>

ТОМ 35

ВЫПУСК 3

МАЙ — ИЮНЬ

Двухмесячный научно-теоретический журнал

Основан в 1955 г.

# ВОПРОСЫ МЕДИЦИНСКОЙ ХИМИИ



МОСКВА · МЕДИЦИНА · 1989



## РЕДАКЦИОННАЯ КОЛЛЕГИЯ:

Главный редактор С. С. ДЕБОВ

В. Б. СПИРИЧЕВ (зам. редактора), И. П. АШМАРИН, Т. Т. БЕРЕЗОВ, А. А. ВАСИЛЬЕВ, Е. Н. ГЕРАСИМОВА, В. З. ГОРКИН, И. Б. ЗБАРСКИЙ, В. Л. КОЗЕЛЬЦЕВ (ответственный секретарь), А. И. 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)

БЕЛИЦЕР В. А. (Киев)

БЫЧКОВ С. М. (Москва)

КОНСТАНТИНОВ А. А. (Хабаровск)

КУДРЯШОВ Б. А. (Москва)

ЛЯХОВИЧ В. В. (Новосибирск)

ПАСХИНА Т. С. (Москва)

ТРОИЦКИЙ Г. В. (Симферополь)

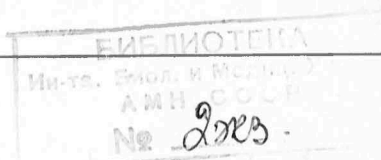
ТУРАКУЛОВ Я. Х. (Ташкент)

ТЯХЕПЫЛД Л. Я. (Тарту)

ШАПОВ В. С. (Москва)

ЯКОВЛЕВ Н. Н. (Ленинград)

ЯСАЙТИС А. А. (Вильнюс)



*Н. В. Трубицына, А. М. Михеев, В. А. Березин, О. Е. Ефимов,  
Л. И. Привалова*

## АНАЛИЗ БЕЛКОВ СЫВОРОТКИ КРОВИ БОЛЬНЫХ ХРОНИЧЕСКИМ АЛКОГОЛИЗМОМ МЕТОДОМ ПЕРЕКРЕСТНОГО ИММУНОЭЛЕКТРОФОРЕЗА

НИИ биологии Днепронетровского университета, Днепронетровская областная психоневрологическая больница, Запорожский институт усовершенствования врачей

Выявление биологических маркеров алкоголизма имеет важное значение как для установления степени риска развития органических поражений, так и для поиска новых методов лечения алкоголизма [12]. Так, определение уровня активности гаммаглутамилтрансферазы, аспартат- и аланинаминотрансфераз, альдегиддегидрогеназы и алкогольдегидрогеназы в сыворотке крови позволяет не только подтверждать достоверность диагностики, но и в определенной мере выявлять группу риска по алкоголизму [7]. Однако в целом ряде случаев такая биохимическая диагностика не дает однозначных результатов для больных хроническим алкоголизмом. Причина в том, что у этих больных длительное употребление алкоголя приводит к значительным и разнообразным изменениям систем и органов, на фоне которых трудно дифференцировать специфичность изменения того или иного показателя. Особенно это касается случаев, когда развиваются различные формы алкогольной болезни печени (алкогольный гепатит и цирроз).

Несомненно, необходим поиск новых специфических биохимических маркеров алкоголизма — не только для установления степени риска развития органических поражений, но и для подтверждения эффективности проведенного курса лечения.

Задачей настоящей работы являлось сравнение количественного содержания индивидуальных белков сыворотки крови доноров и больных хроническим алкоголизмом, определенного методами перекрестного иммуноэлектрофореза. Применение различных вариантов иммуноэлектрофореза позволяет также идентифицировать отдельные белки в сложной смеси антигенов [1]. Ранее проводились исследования по белкам сыворотки крови при действии алкоголя на организм [8]. Однако используемые методы разделения

и регистрации позволяли не идентифицировать индивидуальные белки, а количественно оценивать суммарные белковые фракции.

### Методика

Обследовано 15 здоровых доноров и 15 больных со стажем регулярного приема алкоголя в среднем 20 лет. Образцы сыворотки крови получали от вновь поступивших больных хроническим алкоголизмом до начала лечения. Белки сыворотки крови разделяли методом перекрестного иммуноэлектрофореза [3]. Использовали 1 % агарозный гель со средним электроэндоосмосом. Электрофорез в первом направлении проводили в трис-вероналовом буфере с ионной силой 0,02 и pH 8,6 в течение 40 мин при напряжении электрического поля 10 В/см. Электрофорез в перпендикулярном направлении проводили в течение ночи при напряжении 1—2 В/см в агарозном геле, содержащем кроличью полиспецифическую антисыворотку к белкам сыворотки крови человека (НИИ эпидемиологии и микробиологии, г. Горький).

Идентификацию отдельных иммунопреципитов осуществляли перекрестно-линейным иммуноэлектрофорезом с введением в промежуточный гель соответствующих моноспецифических антисывороток ("Sevac", СССР). В этом случае идентифицируемый белок преципитировался моноспецифической антисывороткой в промежуточном геле и иммунопреципитат отсутствовал в верхней (анодной) части геля, который содержал полиспецифическую антисыворотку. Таким способом идентифицировали преальбумин, альбумин и трансферрин. Наличие соответствующих белков-стандартов позволяло выражать концентрацию этих белков в г/л. Количественное содержание этих антигенов контролировали также ракетным иммуноэлектрофорезом. Идентификацию церулоплазмينا и гаптоглобина проводили путем анализа иммунопреципитатов в геле с помощью соответственно пара-фенилендиамина [6] и бензидина [5]. Белок  $\alpha_1$ -антитрипсина выявляли перекрестным иммуноэлектрофорезом по уменьшению электрофоретической подвижности соответствующего иммунопреципитата при введении в гель в 1-м направлении трипсина (28 мкг/см<sup>2</sup> геля). Другие белки ( $\alpha_1$ -антихимотрипсин, гемопексин) идентифицировали перекрестно-линейным иммуноэлектрофорезом с введением в промежуточный гель предварительно частично очищенных белков сыворотки крови. При этом наблюдался подъем отдельного иммунопреципитата над линией. Правильность идентификации иммунопреципитатов све-

Содержание белков сыворотки крови у здоровых доноров ( $n = 15$ ) и больных хроническим алкоголизмом ( $n = 15$ )

№ п/п	Белок	$M \pm m$		Пределы варьирования	
		Доноры	Больные	Доноры	Больные
1	Пресальбумин, г/л	$0,71 \pm 0,07$	$0,66 \pm 0,07$	$0,45 - 0,92$	$0,34 - 1,04$
2	Альбумин, г/л	$27,7 \pm 2,0$	$25,9 \pm 2,5$	$17,0 - 41,6$	$15,0 - 47,2$
3	$\alpha_1$ -Антитрипсин, усл. ед.	$73,0 \pm 5,7$	$106,5 \pm 14,7$ ( $p < 0,05$ )	$44,0 - 120,1$	$35,0 - 248,2$
4	$\alpha_1$ -Антихимотрипсин, усл. ед.	$17,2 \pm 2,8$	$11,7 \pm 2,5$	$6,1 - 35,9$	$4,0 - 21,1$
5	Церулоплазмин, усл. ед.	$10,3 \pm 1,3$	$8,9 \pm 1,7$	$5,0 - 17,5$	$3,1 - 17,5$
6	Гаптоглобин, усл. ед.	$36,5 \pm 3,8$	$59,7 \pm 12,0$	$14,0 - 71,8$	$17,5 - 200,0$
7	Трансферрин, г/л	$2,2 \pm 0,3$	$2,4 \pm 0,5$	$1,2 - 4,5$	$1,0 - 8,0$
8	Гемопексин, г/л	$51,4 \pm 6,7$	$71,7 \pm 14,0$	$15,0 - 120,1$	$32,3 - 240,5$
9	IgG, г/л	$9,6 \pm 1,2$	$14,2 \pm 2,3$	$6,2 - 12,1$	$5,4 - 35,5$
10	IgM, г/л	$1,1 \pm 0,2$	$1,3 \pm 0,1$	$0,8 - 1,7$	$0,6 - 2,2$
11	IgA, г/л	$1,6 \pm 0,3$	$1,9 \pm 0,3$	$0,7 - 4,1$	$0,5 - 4,6$
12	Общий белок, г/л	$101,3 \pm 3,5$	$89,0 \pm 7,2$	$84,8 - 122,4$	$47,2 - 140,8$

ряли с соответствующими атласами [4, 9]. Из-за отсутствия белков-стандартов в данном случае их содержание в сыворотке крови выражали в условных единицах (пропорциональных площадям, ограничивающим соответствующие иммунопреципитаты, и количеству внесенной в гель сыворотки). Пример перекрестного иммуноэлектрофореза белков сыворотки крови человека с указанием положения идентифицированных компонентов представлен на рис. 1, см. вклейку.

Концентрацию иммуноглобулинов различных классов IgG, IgM и IgA в сыворотке крови доноров и больных определяли методом радиальной иммунодиффузии с использованием соответствующих моноспецифических антисывороток [2]. Общий белок определяли методом Лоурн [11].

## Результаты и обсуждение

Полученные результаты определения белков сыворотки крови здоровых доноров и больных хроническим алкоголизмом представлены в таблице. Обращает на себя внимание тот факт, что из 12 показателей (включая содержание общего белка) только в одном случае наблюдаются достоверные различия у больных и здоровых людей. Содержание  $\alpha_1$ -антитрипсина в среднем возрастает на 45 % у больных хроническим алкоголизмом.

Для остальных белков, включая иммуноглобулины, получены близкие средние величины для здоровых людей и больных. Однако размах индивидуальных колебаний значений практически всех показателей у больных значительно шире по сравнению со здоровыми донорами. При этом для большинства изученных белков расширение диапазонов индивидуальных различий наблюдается как в сторону снижения, так и увеличения значений

показателей. Часто эти изменения на 100—300 % превышают средние величины. Имеются данные о том, что при алкогольных гепатитах и циррозах часто наблюдается повышенный уровень IgG, IgM, IgA [13]. Однако в исследуемых нами случаях гипергаммаглобулинемии не наблюдалось (см. таблицу).

Приведенные в таблице результаты дают возможность сравнивать только соответствующие усредненные величины в сыворотке крови здоровых и больных людей. Однако они не позволяют сравнивать различные показатели между собой, за исключением тех случаев, когда концентрация белков выражена в г/л. Это связано с тем, что величины площадей соответствующих иммунопреципитатов зависят не только от концентрации антигена, но и от парциальной концентрации специфических к данному антигену антител в геле, который содержит полиспецифическую антисыворотку. Поэтому в случае выражения результатов в условных единицах (пропорциональных площадям, но не соотношенных к стандартной концентрации белка) сравнимыми оказываются величины, измеренные при условии равенства концентрации антител. Это условие сохраняется только в пределах различных концентраций одних и тех же (но не разных) антигенов (белков). Способ представления результатов в таблице также не дает возможности сравнить между собой направленность и выраженность изменений различных показателей у одного и того же индивида по отношению к усредненным величинам.

Для того чтобы осуществить такое

К ст. *Е. А. Чирятева* и соавт.

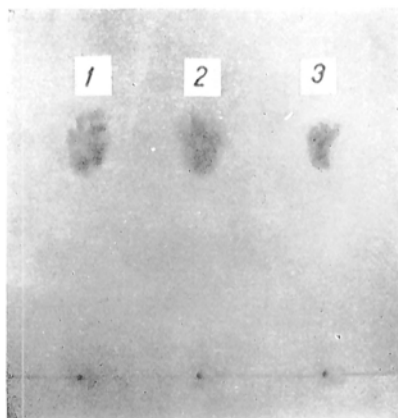


Рис. 2. Хроматограмма пептидных ингибиторов самосборки фибрина на бумаге FN-11.

1, 2, 3 — пептидные ингибиторы, соответствующие трем пикам антиполимеризационной активности (см. рис. 1).

К ст. *Н. В. Трубицыной* и соавт.

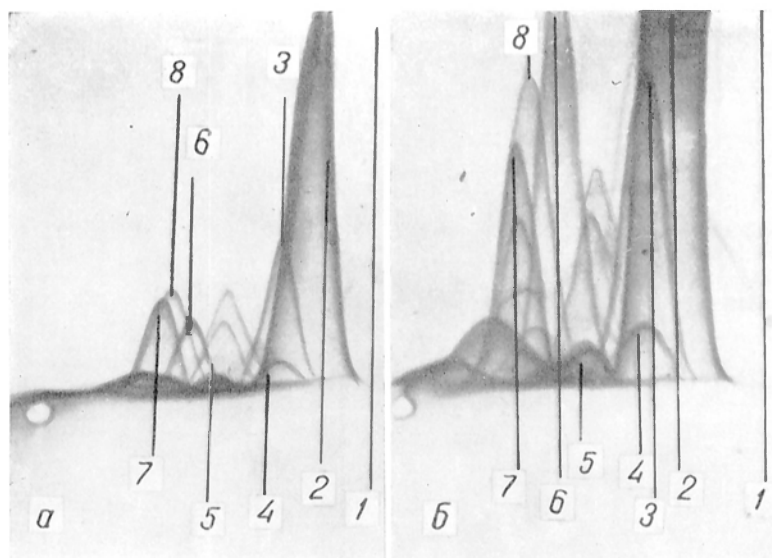
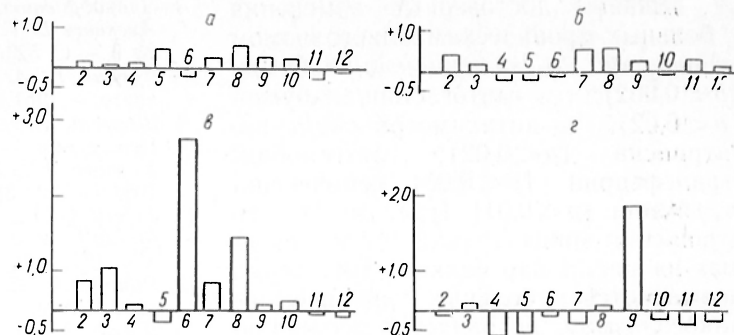


Рис. 1. Перекрестный иммуноэлектрофорез белков двух различных образцов (*А* и *Б*) сыворотки крови человека.

В лунку вносили 5 мкл в 20 раз разведенной сыворотки крови. Верхний гель содержал 5,5 мкл кроличьей полиспецифической антисыворотки на 1 см<sup>2</sup> геля, толщиной 0,15 см. 1 — преальбумин; 2 — альбумин; 3 —  $\alpha_1$ -антитрипсин; 4 —  $\alpha_2$ -антихимотрипсин; 5 — церулоплазмин; 6 — гаптоглобин; 7 — трансферрин; 8 — гемонексин.

Рис. 2. Характеристические спектры белков сыворотки крови у здоровых доноров (А, Б) и больных хроническим алкоголизмом (В, Г).

По оси ординат: приведенные к средней величине значения для каждого показателя (объяснения см. в тексте). Порядок обозначения отдельных белков по оси абсцисс соответствует нумерации, приведенной на рис. 1 и в таблице.



сравнение, рассчитывали приведенные к средней величине значения для каждого показателя. Для расчета значений белков сыворотки крови доноров

использовали выражение:  $\pm \frac{x_i - \bar{X}}{\bar{X}}$ ,

где  $x_i$  — индивидуальное значение показателя;  $\bar{X}$  — среднее арифметическое. Приведенные к усредненной норме значения белков сыворотки крови больных хроническим алкоголизмом рассчитывали, исходя из выраже-

ния:  $\pm \frac{y_i - \bar{X}}{\bar{X}}$ , где  $y_i$  — индивиду-

альное значение показателя в сыворотке крови больного;  $\bar{X}$  — среднее арифметическое для соответствующего показателя в сыворотке крови здоровых доноров.

Получаемые таким образом значения показателей для каждого донора или больного сравнимы между собой и в совокупности могут характеризовать особенность белкового состава (спектра) сыворотки крови того или иного индивида. На рис. 2 в качестве примера приведены такие характеристические спектры белков сыворотки крови у 2 здоровых доноров и 2 больных хроническим алкоголизмом. Видно, насколько сильно отличаются изме-

нения значений отдельных показателей относительно усредненной «нормы» у больных хроническим алкоголизмом и у здоровых доноров. Однако эти различия индивидуальны, и показатели у разных людей могут изменяться как в положительную, так и в отрицательную сторону. Поэтому усреднение величин концентраций сывороточных белков у больных хроническим алкоголизмом (см. таблицу) не позволяет выявить четких достоверных отличий по сравнению с группой здоровых доноров. Даже в тех случаях, когда такие достоверные различия выявляются ( $\alpha_1$ -антитрипсин), пределы варьирования признака у 2 исследуемых групп значительно перекрываются. Возможно, что анализ таких характеристических (индивидуальных) спектров белков сыворотки крови будет полезным с прогностической точки зрения при решении вопроса эффективности того или иного способа лечения.

Сравнение содержания всех сывороточных белков по отношению к альбумину, иммуноглобулинов различных классов по отношению друг к другу,  $\alpha_1$ -антихимотрипсина по отношению к  $\alpha_1$ -антитрипсину, гаптоглобина по отношению к трансферрину и гемопекси-

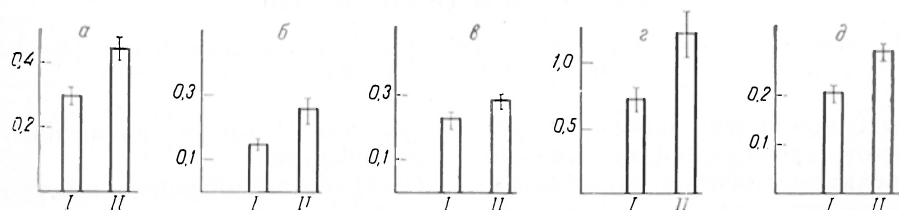


Рис. 3. Относительное содержание некоторых белков сыворотки крови доноров (I) и больных хроническим алкоголизмом (II).

По оси ординат — отношение концентраций: А —  $\alpha_1$ -антитрипсин/альбумин; Б — гаптоглобин/альбумин; В —  $\alpha_1$ -антихимотрипсин/ $\alpha_1$ -антитрипсин; Г — гаптоглобин/трансферрин; Д — гемопексин/альбумин.

ну выявило достоверные изменения у больных хроническим алкоголизмом отношений:  $\alpha_1$ -антитрипсин/альбумин ( $p < 0,002$ ); гаптоглобин/альбумин ( $p < 0,02$ );  $\alpha_1$ -антихимотрипсин/ $\alpha_1$ -антитрипсин ( $p < 0,02$ ); гаптоглобин/трансферрин ( $p < 0,05$ ); гемопексин/альбумин ( $p < 0,01$ ) (рис. 3). То, что отношения концентраций представленных на рис. 3 пар белков достоверно повышаются у больных хроническим алкоголизмом, не является неожиданным. Известно, что такие белки, как  $\alpha_1$ -антитрипсин,  $\alpha_1$ -антихимотрипсин и гаптоглобин, относятся к так называемым «позитивным острофазным белкам». С другой стороны, альбумин и трансферрин являются «негативными» белками острой фазы [10]. Несмотря на то что содержание этих белков, взятых в отдельности, достоверно не изменяется (кроме  $\alpha_1$ -антитрипсина) у больных хроническим алкоголизмом, определение отношения концентраций «позитивных острофазных белков» к «негативным» в сыворотке крови может служить одним из биологических маркеров хронического алкоголизма.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Березин В. А. // Укр. биохим. журн. — 1984. — Т. 52, № 1. — С. 227—237.
2. Бэм Э. // Иммунологические методы: Пер. с нем. — М., 1979. — С. 49—55.
3. Вееке Б. // Руководство по количественному иммуноэлектрофорезу: Пер. с англ. — М., 1977. — С. 58—73.
4. Крелль И. // Там же. — С. 103—107.
5. Маурер Г. Диск-электрофорез: Пер. с нем. — М., 1971. — С. 93.
6. Фримель Х. // Иммунологические методы: Пер. с нем. — М., 1987. — С. 108—115.

УДК 616.373.03:[616.127-005.8-036.11-078.73

Л. Г. Рашковецкий, Ф. С. Носков, В. Н. Прозоровский, Б. Ф. Коровкин

### ПОЛУЧЕНИЕ СТАФИЛОКОККОВОГО ИММУНОСОРБЕНТА, СЕНСИБИЛИЗИРОВАННОГО АНТИТЕЛАМИ К М-СУБЪЕДИНИЦАМ ЛДГ

НИИ медицинской энзимологии АМН СССР, Москва, НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Пастера, Ленинград

В настоящее время одним из перспективных направлений в клинической биохимии является создание иммунохимических методов определения изоформ ряда ферментов. Разработка иммунохимических методов позволит значительно увеличить как специфичность, так и чувствительность диагно-

7. Чернобровкина Т. В., Кершенгольц Б. М., Алексеев В. Г. и др. // Лаб. дело. — 1986. — № 9. — С. 523—525.
8. Чуркин Е. А. // Журн. невропатол. и психиатр. — 1967. — № 2. — С. 280—283.
9. Ширгель Б. // Иммунологические методы: Пер. с нем. — М., 1979. — С. 24—29.
10. Kushner J. // Ann. N. Y. Acad. Sci. — 1982. — Vol. 389. — P. 39—48.
11. Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., Randall R. J. // J. biol. Chem. — 1951. — Vol. 193. — P. 265—275.
12. Poupon R. E. // Gastroent. Clin. Biol. — 1987. — Vol. 11, N 5. — P. 412—417.
13. Wands J. R. // Biochemistry and Pharmacology of Ethanol. — New York, 1979. — Vol. 1. — P. 641—658.

Поступила 21.04.88

### ANALYSIS OF PROTEINS IN BLOOD SERUM OF PATIENTS WITH CHRONIC ALCOHOLISM USING CROSS IMMUNOELECTROPHORESIS

N. V. Tributsina, A. A. Mikheev, V. A. Berezin, O. E. Efimov, L. I. Privalova

State University, Psychoneurological Hospital, Dnepropetrovsk, Institute for Postgraduate Training of Physicians, Zaporozhje

Prealbumin, albumin,  $\alpha_1$ -antitrypsin,  $\alpha_1$ -antichymotrypsin, ceruloplasmin, haptoglobin, transferrin, IgG, IgM and IgA were studied in blood serum of healthy donors and of patients with chronic alcoholism by means of cross immunoelectrophoresis and immunodiffusion. Only content of  $\alpha_1$ -antitrypsin was distinctly altered in blood serum of the patients with alcoholism as compared with normal state, while individual variations in content of the proteins studied were considerably higher in blood serum of the patients. At the same time, distinct dissimilarity of the patterns studied was found between healthy donors and patients with chronic alcoholism when concentration ratios of some positively and negatively charged acute phase proteins were calculated ( $\alpha_1$ -antitrypsin/albumin, haptoglobin/albumin, haptoglobin/transferrin).

стических тестов по сравнению с существующими.

Разработанный ранее иммунохимический способ определения изофермента ЛДГ-1, важного для диагностики острого инфаркта миокарда [6, 8], хорошо зарекомендовал себя на практике [5, 7—9] в сравнении с тради-