

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)

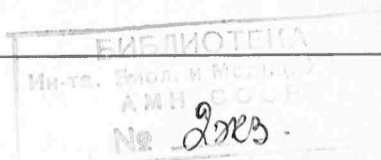
ТУРАКУЛОВ Я. Х. (Ташкент)

ТЯХЕПЫЛД Л. Я. (Тарту)

ШАПОВ В. С. (Москва)

ЯКОВЛЕВ Н. Н. (Ленинград)

ЯСАЙТИС А. А. (Вильнюс)



- Glucocorticoid Hormone Action / Eds J. Baxter, G. G. Rousseau. — Berlin, 1979. — P. 341—353.
19. Okret S., Poellinger L., Yu Dong et al. // Proc. nat. Acad. Sci. USA. — 1987. — Vol. 83. — P. 5899—5903.
 20. Scatchard G. // Ann. Chem. Soc. — 1949. — Vol. 51. — P. 660—672.
 21. Schlechte J., Ginsberg B., Sherman B. // J. steroid Biochem. — 1982. — Vol. 16, N 1. — P. 69—74.
 22. Smith K. A., Crabtree G. R., Kennedy S. J., Munk A. // Nature. — 1977. — Vol. 267. — P. 523—526.
 23. Svec F. // Life Sci. — 1985. — Vol. 36, N 25. — P. 2359—2366.
 24. Rousseau G. G., Baxter J. D. // Glucocorticoid Hormone Action / Eds J. Baxter, G. G. Rousseau. — Berlin, 1979. — P. 49—77.

Поступила 09.11.87

ON THE ACTIVATION OF LYMPHOCYTE GLUCOCORTICOID RECEPTORS IN ACUTE MYOCARDIAL INFARCTION

I. E. Petrichenko, A. Sh. Sharlava, Yu. A. Shakhov

Institute of Preventive Cardiology, All-Union Cardiological Research Centre, Academy of Medical Sciences of the USSR, Moscow

Dose-dependent increase in content of highly specific binding sites for glucocorticoids (receptors), but without alteration in their affinity to the hormone, was observed after incubation during 2 hrs of healthy donor lymphocytes with blood serum of patients with acute myocardial infarction. The similar effects exhibited protein extracts of necrotized and normal parts of human myocardium (heart antigens) as well as the autologous blood serum and human blood serum albumin treated with UV-irradiation. Number of receptors was not altered in human skin fibroblasts incubated both with the patients blood serum and with the UV-treated blood serum. Antigenic effects of protein components, developed in blood serum after acute myocardial infarction, on cells of the lymphoid system appear to be responsible for the increase in number of binding sites for glucocorticoids in lymphocytes of patients with acute myocardial infarction or in lymphocytes of healthy donors incubated with the patients blood serum.

УДК 616-006.04-07:616.153.1:577.152.313]-092

Л. П. Пашинцева, С. О. Гудима, Е. А. Козырева, А. В. Воронов,
А. А. Миериня, Л. С. Бассалык, Ю. Ю. Венгеров, И. И. Вогрин

ПЛАЦЕНТАРНАЯ ЩЕЛОЧНАЯ ФОСФАТАЗА — МАРКЕР ЗЛОКАЧЕСТВЕННЫХ НОВООБРАЗОВАНИЙ

Всесоюзный онкологический научный центр АМН СССР, Москва; Институт прикладной молекулярной биологии Минздрава СССР, Москва; НИИ медицинской энзимологии АМН СССР, Москва

Исследование общей активности щелочной фосфатазы (ЩФ) и особенно ее изоферментов широко используется при диагностике и наблюдении за течением заболевания у онкологических больных. В последнее десятилетие внимание онкологов привлекли другие изоферменты ЩФ — плацентарный, плацентарноподобный, Нагао, Касахара, обнаруженные как в злокачественных опухолях, так и в сыворотке. В среднем увеличение активности плацентарной ПЩФ (ПЩФ) обнаруживается в сыворотке 5—20 % больных раком. Однако при ряде локализаций злокачественных опухолей частота выявления ПЩФ гораздо выше. Предложено [2, 4, 7] использовать ПЩФ в качестве маркера преимущественно для раннего выявления метастазов и рецидивов рака яичников и яичка, а также для наблюдения за эффективностью лечения. Иммуноферментные

методы, широко используемые в настоящее время, благодаря высокой чувствительности и специфичности обладают значительными преимуществами по сравнению с применявшимися ранее. В связи с этим разработка и внедрение отечественного иммуноферментного метода определения ПЩФ являются чрезвычайно важными. В данном исследовании приведены результаты оценки чувствительности, специфичности и значимости определения ПЩФ в качестве маркера рака с помощью разработанного нами иммуноферментного метода.

Методика

Активность ПЩФ в сыворотке определяли методом твердофазного иммуноферментного анализа (ИФА). Антитела, специфичные к ПЩФ, очищали биоспецифической хроматографией на агарозе с иммобилизацией ПЩФ. В качестве стандарта как при иммунизации,

Активность и частота выявления плацентарной щелочной фосфатазы в сыворотке крови онкологических больных и практически здоровых людей

Группа обследованных	Число случаев	Частота выявления, %	Активность ПЩФ, Ед/л	Частота случаев выявления активности ПЩФ выше 0,15 Ед/л, %
Здоровые	53	32 (17/53)	$0,094 \pm 0,027$ 0—0,14	0 (0/53)
Онкологические больные	61	41 (25/61)	$0,69 \pm 1,37$ 0,03—8,37	20* (12/61)
Больные раком яичника	11	72 (8/11)	$1,95 \pm 4,4$ 0,09—12,6	54* (6/11)

Примечание. Звездочка — $p < 0,001$.

так и для анализа был использован электрофоретический гомогенный препарат ПЩФ, имеющий общую ферментную активность 10 000 Ед/л.

Пластины для ИФА активировали поликлональными кроличьими антителами, специфически связывающими ПЩФ, инкубировали их 16—18 ч при 4°C или 2 ч при 37°C. Затем тестируемые образцы сыворотки больных, предположительно содержащие ПЩФ, и пробы антигена-стандарта с заранее известной концентрацией инкубировали с иммобилизованными на твердой фазе анти-ПЩФ антителами при 37°C в течение 60 мин. Использовали цельные сыворотки, а также разведенные буфером в соотношении 1:1. Объем проб составлял 200 мкл. Связывание с антителами не блокирует активный центр исследуемого фермента, что позволяет оценивать активность ПЩФ в пробе по количеству антигена, связавшегося с антителами.

На завершающем этапе использовали реакцию расщепления паранитрофенилфосфата (инкубация 2 ч при 37°C). Количественно результаты анализа оценивали с помощью сканирующего спектрофотометра типа «Multiscan» при длине волны 405 нм. Чувствительность метода составила 0,033 ЕД/л, рабочий диапазон — 0,1—6,0 Ед/л. Стандартную калибровочную кривую для определения активности ПЩФ строили с помощью проб антигена с известным значением общей активности фермента.

Активность ПЩФ изучали в сыворотке крови. В качестве контроля и для установления нормальных значений активности ПЩФ исследовали сыворотку крови практически здоровых людей (45 мужчин, 8 женщин) в возрасте от 25 до 45 лет — 1-я группа. 2-ю группу составили первичные онкологические больные (61 человек — больные раком желудка, молочной железы, простаты, яичников, яичка, печени, а также меланомой). Была выделена группа первичных больных раком яичников (II—IV стадии, 11 человек) — 3-я группа. Перед началом исследования сыворотку крови прогревали в течение 10 мин при 65°C. Общую активность ЩФ исследовали с использованием в качестве субстрата динатриевой соли паранитрофенилфосфата на анализаторе ФП 901 (Финляндия), изоферменты ЩФ — с помощью электрофореза на 0,6 % агаровом геле с последующей окраской (β -нафтилфосфат натрия, прочный синий РР, бикарбонатный буфер рН 10,02) [1].

Результаты и обсуждение

При проведении скрининга сывороток практически здоровых лиц и онкологических больных в непрогретых образцах положительная реакция обнаружена соответственно в 53 и 68,2 % случаев, после прогревания — в 32 и 41 % случаев. Снижение частоты положительных результатов после тепловой обработки сыворотки объясняется инактивацией кишечного изофермента, который имеет общие с ПЩФ антигенные детерминанты, и в связи с этим определяется в ходе ИФА одновременно с ПЩФ. При электрофоретическом исследовании кишечный изофермент выявлен лишь в 5 % изученных сывороток при активности не менее 2,0—4,0 Ед/л. После тепловой обработки положительная реакция исчезала в 20 % случаев; это свидетельствует о том, что кишечная фосфатаза присутствует в сыворотке чаще, чем можно предполагать на основании электрофоретического метода исследования. В крови онкологических больных также наблюдалось снижение (но не исчезновение) активности в тесте на ПЩФ в 2—45 раз после прогревания сыворотки. Этот факт может быть объяснен либо наличием кишечного изофермента ЩФ, либо присутствием термоллабильных форм ПЩФ одновременно с термостабильными.

Результаты исследования активности ПЩФ в подвергшихся тепловой обработке образцах сыворотки крови практически здоровых людей и онкологических больных представлены в таблице. Как видно, в сыворотках здоровых лиц активность ПЩФ обнаруживается достаточно часто, однако величины активности низкие. По ре-

результатам исследования группы здоровых лиц за критическую величину нами принята активность ПЩФ, равная 0,15 Ед/л ($\bar{X}+2S$). Активность ПЩФ в 1-й группе эту величину не превышала ни в одном случае. Выявление следовых количеств ПЩФ у здоровых людей отмечено и другими авторами при изучении тканей и сывороток [8].

Средние величины активности ПЩФ у онкологических больных и особенно у больных раком яичников были существенно выше, чем у здоровых лиц ($p<0,001$). Анализ данных, приведенных в таблице, показал, что в случае выявления активности ПЩФ ее уровень выше 0,15 Ед/л обнаружен у 48 % (12 из 25) больных 2-й группы и у 75 % (6 из 8) больных 3-й группы (см. третью графу). Наиболее высокие величины активности ПЩФ выявлены у больных раком яичников, яичка и желудка.

Сопоставление частоты случаев выявления ПЩФ с величиной общей активности ЩФ у онкологических больных показало, что как при нормальной, так и при повышенной активности фермента ПЩФ обнаруживается примерно с одинаковой частотой (18,5 и 22 % случаев соответственно). По-видимому, синтез ПЩФ чаще всего не приводит к увеличению активности ЩФ, которая повышается за счет других изоферментов. Так, наиболее высокая величина активности ПЩФ, полученная нами (12,7 Ед/л), была обнаружена у больной с активностью ЩФ в пределах нормальных значений. Следовательно, скрининг на ПЩФ может быть информативным даже при отсутствии предварительного определения общей активности ЩФ.

Примененный вариант эндогенного ИФА ПЩФ по своим параметрам (чувствительность, специфичность, рабочий диапазон активностей ПЩФ) близок к существующим системам ИФА [2, 7]. Полученные нами с помощью этого метода результаты изучения ПЩФ сыворотки крови в основном сопоставимы с данными других исследователей, использующих как поли-, так и моноклональные антитела. Так, по данным Pollet O. E. и соавт. [8], уровень ПЩФ выше критического у онкологических больных обнаружен в 9,8 %, по данным Eerdeken M. W. и соавт. [3] — в 20 % случаев.

Согласно данным Nouwen E. J. и

соавт. [7], активность ПЩФ выше 0,1 Ед/л обнаруживалась у 58 % больных раком яичников, выше 0,2 Ед/л — у 46 %. Активность ПЩФ более 0,2 Ед/л эти авторы считали специфичной для рака. Наши данные пока не позволяют высказаться столь категорично, так как необходимы большее число наблюдений, исследования в динамике, детальный анализ гистологического строения опухолей.

В последних работах Maslow W. C. и соавт. [5], а также другие исследователи сообщают о повышении частоты случаев выявления ПЩФ и величины ее активности у курящих и в связи с этим о необходимости учитывать этот фактор при анализе полученных данных. Мы, так же как и Nouwen E. J. и соавт. [6], не нашли существенной разницы между активностью ПЩФ в сыворотке курящих и некурящих в группе здоровых лиц, однако 3 наиболее высоких показателя — 0,12, 0,13, 0,14 Ед/л — обнаружены нами у курильщиков.

Результаты проведенного исследования позволяют считать, что изучение ПЩФ, как и других вариантов эктопических и эмбриональных белков в качестве маркера в сыворотке и тканях онкологических больных, перспективно и представляет несомненный интерес в практическом и теоретическом отношении.

При обследовании группы практически здоровых лиц удалось установить критический уровень активности ПЩФ в сыворотке — 0,15 Ед/л ($\bar{X}+2S$), превышение которого следует считать патологическим.

Показано увеличение активности ПЩФ выше критического уровня в сыворотке 20 % первичных онкологических больных при различной локализации рака, 54 % больных раком яичника, что позволяет говорить о возможности использования ПЩФ в качестве маркера злокачественности, особенно при опухолях яичника, яичка.

ЛИТЕРАТУРА

1. Пашинцева Л. П. // Методы клинической биохимии. — М., 1982. — С. 12—22.
2. De Broe M. E., Nouwen E. J., Pollet D. E. et al. // *Advanc. clin. Enzym.* — 1986. — Vol. 3. — P. 39—52.
3. Eerdeken M. W., Nouwen E. J., Pollet D. E. et al. // *Clin. Chem.* — 1985. — Vol. 31. — P. 687—690.
4. Fishman W. H. // *Cancer Bull.* — 1980. — Vol. 32. — P. 45—47.

5. Maslow W. C., Muensch H. A., Azama F., Scheider S. // Clin. Chem. — 1983. — Vol. 29. — P. 260—263.
6. Nouwen E. J., Pollet D. E., Eerdeken M. W. et al. // Cancer Res. — 1986. — Vol. 46. — P. 866—876.
7. Nouwen E. J., Pollet D. E., Eerdeken M. W. et al. // Ibid. — 1985. — Vol. 45. — P. 892—902.
8. Pollet D. E., Nouwen E. J., Schelstraete J. B. et al. // Clin. Chem. — 1985. — Vol. 31. — P. 41—45.

Поступила 27.11.87

PLACENTAL ALKALINE PHOSPHATASE AS A MARKER OF MALIGNANT NEOPLASMS

L. P. Pashintseva, S. O. Gudima, E. A. Kozyreva, A. V. Voronov, A. A. Mierinya, L. S. Basalyk, Yu. Yu. Vengerov, I. I. Votrin

All-Union Oncological Research Centre, Institute of Medical Enzymology, Academy of Medical Sciences of the USSR, Institute of Applied Molecular Biology, Ministry of Public Health of the USSR, Moscow

Activity of placental alkaline phosphatase (PAP) was studied in blood serum of 53 healthy persons and of 72 oncologic patients, using solid-phase immunoenzymatic analysis with polyclonal antibodies towards PAP. The enzyme was detected both in blood serum of healthy persons and of oncologic patients. The blood serum under study was preheated at 65° in order to inactivate the intestinal phosphatase — the only isoenzyme cross-reacting with antibodies to thermostable PAP. This controlled heating treatment decreased distinctly the possibility of pseudopositive reactions. The limiting values of the PAP activity were about 0.15 un/L in blood sera of healthy persons. Higher values were considered as an evidence of pathological state. After screening analysis of blood sera from patients with various forms of malignant tumors the PAP activity above 0.15 un/L was observed in 20 % of the patients; the enzymatic activity exceeded these values in 54 % of patients with ovary carcinoma. The data obtained suggest that the procedure developed as an adequate means for estimation of thermostable PAP isoenzymes as well as that the rate of PAP activity might serve as marker of malignancy in ovary and testis carcinomas independently on level of total activity of alkaline phosphatase.

thy persons and of 72 oncologic patients, using solid-phase immunoenzymatic analysis with polyclonal antibodies towards PAP. The enzyme was detected both in blood serum of healthy persons and of oncologic patients. The blood serum under study was preheated at 65° in order to inactivate the intestinal phosphatase — the only isoenzyme cross-reacting with antibodies to thermostable PAP. This controlled heating treatment decreased distinctly the possibility of pseudopositive reactions. The limiting values of the PAP activity were about 0.15 un/L in blood sera of healthy persons. Higher values were considered as an evidence of pathological state. After screening analysis of blood sera from patients with various forms of malignant tumors the PAP activity above 0.15 un/L was observed in 20 % of the patients; the enzymatic activity exceeded these values in 54 % of patients with ovary carcinoma. The data obtained suggest that the procedure developed as an adequate means for estimation of thermostable PAP isoenzymes as well as that the rate of PAP activity might serve as marker of malignancy in ovary and testis carcinomas independently on level of total activity of alkaline phosphatase.

УДК 612.751.2.015.348:577.112.34].08

Ф. Е. Романцев, В. Н. Прозоровский, Е. А. Козлов, Д. А. Карпов,
Е. Л. Требухина, А. А. Ржанинова

ОПРЕДЕЛЕНИЕ АМИНОКИСЛОТНОГО СОСТАВА ХРЯЩЕВОЙ ТКАНИ И ИЗОФЕРМЕНТОВ КРЕАТИНФОСФОКИНАЗЫ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ФЕНИЛТИОКАРБАМИЛЬНЫХ ПРОИЗВОДНЫХ АМИНОКИСЛОТ

НИИ медицинской энзимологии АМН СССР, Москва

В настоящее время наиболее распространенным и эффективным методом определения содержания аминокислот (АК) является жидкостная хроматография высокого давления, которая применяется в двух вариантах: с предколоночной или постколоночной модификацией аминокислот. Многочисленные методы постколоночной дериватизации, основанные на использовании нингидрина [12, 16], о-фталевого альдегида [4, 8], флюорескамина [6, 18, 21, 22], а также методы предколоночной модификации с применением данзилхлорида [2, 10, 15, 23], дабсилхлорида [7, 20] и о-фталевого альдегида [3, 5, 9, 13], как правило, имеют один из следующих недостатков: нестабильность производных АК; необходимость установки второго и третьего постколоночного реактора; невозможность одновременной идентификации пролина, оксипролина и основных АК; необходимость

использования инертного газа при хроматографии; трудности, связанные со спецификой спектральной регистрации производных АК.

Наиболее перспективным и, вероятно, более совершенным является метод Хейприксон и Мереди, основанный на модификации АК с помощью фенилизотиоцианата с последующим их разделением методом обращенно-фазной хроматографии [11]. Однако этот метод имеет ряд недостатков: высокая токсичность растворителей, используемых при хроматографии (ацетонитрил, метанол), отсутствие более коротких программ разделения АК, необходимых для ускоренного проведения анализа в целом (для экспресс-анализа). С другой стороны, необходимы также и более продолжительные программы, отличительной чертой которых является повышенная разрешающая способность и возможность проводить идентификацию как