Научно-исследовательский институт биомедицинской химии имени В.Н.Ореховича

Архив журнала

Вопросы медицинской химии

ISSN 0042-8809

1989

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

1989

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

(c) Orekhovich Institute of Biomedical Chemistry of the Russian Academy of Medical Sciences

АКАДЕМИЯ МЕДИЦИНСКИХ НАУК СССР

ТОМ 35

ВЫПУСК 5

СЕНТЯБРЬ — ОКТЯБРЬ

Двухмесячный научно-теоретический журнал

Основан в 1955 г.

МОСКВА · МЕДИЦИНА · 1989

ВОПРОСЫ МЕДИЦИНСКОЙ ХИМИИ

РЕДАКЦИОННАЯ КОЛЛЕГИЯ:

Главный редактор С. С. ДЕБОВ

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

2 экз

7. *Горошинская И. А., Броновицкая З. Г., Кричевская А. А., Кабарухина Е. Г.* // Нейрохимия. — 1982. — № 3. — С. 282—286.
8. *Горошинская И. А., Кричевская А. А., Броновицкая З. Г.* // Бюл. экспер. биол. — 1981. — № 4. — С. 431—433.
9. *Каган В. Е., Смирнов А В., Савов В. М., Горкин В. З.* // Вопр. мед. химии. — 1984.— № 1. — С. 112—118.
10. *Кричевская А. А., Горошинская И. А., Федоренко Г.. М., Ходакова А. А.* // Нейрохимия. — 1986. — № 1. — С. 37—44.
11. *Селиченко В. В., Полуэктов Л. В., Конвай В. Д.* // Бюл. экспер. биол. — 1983. — № 7. — С. 12—14.
12. *Хужамбердиев М. М., Сайдуллаев Т., Мамадиев М., Горкин В. З.* // Нейрохимия. — 1986. — № 3. — С. 277—285.
13. *Bradjorl M.* // Analyt. Biochem. — 1976. — Vol. 72. — P. 248—251.
14. *Cvejic V., Micic D. V., Djuricic B. M.* et al. // Acta neuropath. — 1980. — Vol. 51. — P. 71—77.
15. *Gurd J. W., Jones L. R., Mahler H. R., Moore W. J.* // J. Neurochem. — 1974. — Vol. 22. — P. 281—290.
16. *Hall T. R., Figueroa H. R.* // Pharmacol. Res. Commun. — 1982. — Vol. 14, N 5. — P. 431—441.
17. *Imaizumi S., Kayama T., Suzuki J.* // Stroke. — 1984. — Vol. 15, N 6. — P. 1061—1065.
18. *Kobayashi M., Lust W. D., Passonneau J. V.* // J. Neurochem. — 1977. — Vol. 29, N 1. — P. 53—59.
19. *Krajl M.* // Biochem. Pharmacol. — 1965. — Vol. 14. — P. 1683—1685.
20. *Morgan I. G., Wolfe L. S., Mandel P., Gombos G.* // Biochim. biophys. Acta. — 1971.— Vol. 241. — P. 737—751.
21. *Mršulja B. B., Mršulja B. J., Cvejic V.* et al. // J. Neural. Transmis. — 1978. — Vol. 14. — P. 23—30.
22. *Neff N. H., Yang H.-Y. T.* // Life Sci. — 1974. — Vol. 14, N 11. — P. 2061—2078.
23. *Petito C. K., Pulsinelli W. A.* // J. Neuropath .exp. Neurol. — 1984. — Vol. 43, N 2.— P. 141—153.
24. *Watson B. D., Busto R., Goldberg W. J.* et al. // J. Cerebr. Blood Flow. — 1983. — Vol. 3, N 1. — P. 325—326.
25. *Yang H.-Y. T., Neff N. H.* // J. Pharmacol. exp. Ther. — 1973. — Vol. 187, N 2. — P. 365—371.

Поступила 08.09.88

PROPERTIES OF MONGOLIAN GERBILS BRAIN MONOAMINE OXIDASE DURING CEREBRAL ISCHEMIA

I. A. Goroshinskaya, T. Stojanovic, D. V. Micic, B. B. Mrsulja

Institute of Biology, State University, Rostov-on-Don, Institute of Biochemistry, Belgrade Iniversity, Yugoslavia

Properties of monoamine oxidase (МАО) were investigated in mongolian gerbils brain mitochondria isolated from cerebral cortex, striatum and hippocampus during cerebral ischemia. 5 min of ischemia caused inhibition of МАО activity (kynuramine as a substrate), alterations in substrate spesificity and in kinetic curves form deflexion from hyperbolic type in all the brain structures investigated. Alterations in properties of МАО were observed in hippocampus already after I min of ischemia.

УДК 615.919:598.12].017:615.273.53

С. М. Струкова, А. Е. Коган, А. А. Тара, А. А. Аавиксаар

ПРОТИВОТРОМБОТИЧЕСКИЙ ЭФФЕКТ АКТИВАТОРА ПРОТЕИНА С ИЗ ЗМЕИНОГО ЯДА

Кафедра физиологии человека и животных МГУ им. М. В. Ломоносова, сектор биохимии ИХБФ АН ЭССР, Таллинн

Протеин С — витамин К-зависимый белок, циркулирующий в крови в виде профермента — предшественника сериновой протеиназы [11]. Активация протеина С в организме происходит под действием тромбина, который отщепляет от него 14-членный (в случае протеина С из крови быка) пептид, превращая белок в активную форму [7]. Этот процесс происходит при участии рецептора тромбина — тромбомодулина, расположенного на эндотелии сосудов и ускоряющего активацию протеина С на 3 порядка [5]. Активированный протеин С тормозит свертывание крови, расщепляя прокоагулянтные факторы крови V, Va, VIII, VIIIa [9] и, следовательно, является антикоагулянтом. Кроме того, активированный протеин С обладает профибринолитическими свойствами, участвуя в высвобождении тканевого активатора плазминогена [4].

Наследственная недостаточность протеина С сопровождается высоким риском возникновения тромботических и тромбоэмболических осложнений [6]. Однако тромботические осложнения при инфаркте миокарда, диабете [13], нефротическом синдроме [10] не сопровождаются активацией протеина С в крови. В связи с этим поиск экзогенных активаторов протеина С представляется весьма актуальным.

Недавно был получен активатор протеина С из яда щитомордника и использован для определения количества протеина С в плазме крови человека [12]. Однако до сих пор не изучалось влияние экзогенного активатора протеина С на систему гемостаза на уровне целостного организма.

Целью настоящей работы были исследование механизмов влияния активатора протеина С из змеиного яда на систему гемостаза крыс и изучение его противотромботической активности.

Методика

Активатор протеина С из яда щитомордника получали по методу [12] в нашей модификации. Препарат был гомогенен при электрофорезе и имел мол. массу 44 кД. Протеин С из крови быка получали согласно методу [11]. Белок имел мол. массу 62 кД и содержал незначительную примесь протромбина. Активацию протеина С препаратом из змеиного яда проводили, инкубируя 50 мкл (300 мкг/мл) протеина С с активатором в различной концентрации при 37 °С в 0,05 М трис-HCl-буфере pH 7,5. Активность активированного протеина С регистрировали по БАЭЭ-эстеразной активности (БАЭЭ «Реанал», Венгрия) и по удлинению активированного частичного тромбопластинового времени (АЧТВ) плазмы крови человека. Удлинение АЧТВ определяли следующим образом: 50 мкл (300 мкг/мл) протеина С инкубировали 5 мин при 37 °С с равным объемом раствора активатора в различной концентрации, затем добавляли 0,1 мл плазмы крови человека, 0,1 мл каолинкефалиновой смеси и через 1 мин — 0,1 мл 0,03 М раствора $CaCl_2$. Продукты реакции протеина С с активатором анализировали методом электрофореза в 10 % ПААГ в присутствии додецилсульфата натрия (ДС) [8]. Инкубировали 50 мкл (300 мкг/мл) протеина С с 10 мкл (250 мкг/мл) активатора при 37 °С. Через 5, 30 и 60 мин реакцию в соответствующих пробах останавливали кипячением с ДС в течение 3 мин. Фибриногенсвертывающую активность активатора протеина С исследовали, инкубируя 0,2 мл (250 мкг/мл) активатора с 0,2 мл 0,3 % раствора фибриногена (Каунасское предприятие бакпрепаратов) в течение 30 мин при 37 °С. Активность активатора протеина С по отношению к факторам V и VIII исследовали с помощью плазмы, дефицитной по факторам V или VIII («Dade», Швейцария), по методу, рекомендуемому фирмой «Dade». В качестве источника фактора V или VIII использовали плазму, адсорбированную на цитрате бария, которую затем инкубировали с равным объемом активатора (250 мкг/мл). Активность активатора протеина С по отношению к плазминогену и фибринолитическую активность изучали на пластинах стабилизированного фибрина по методу [3]. Изменение АЧТВ плазмы крови крысы регистрировали в системе, содержащей 0,1 мл плазмы крови крысы, 0,1 мл раствора активатора в различной концентрации, 0,1 мл каолинкефалиновой смеси, к которой через 1 мин инкубации добавляли 0,1 мл 0,03 М раствора $CaCl_2$. Способность активатора превращать протромбин плазмы крови в тромбин исследовали, инкубируя активатор (250 мкг/мл) с плазмой крови и регистрируя время свертывания плазмы.

В опытах in vivo исследовали динамику действия активатора протеина С на состояние свертывающей системы крови (21 белая крыса массой тела 200—250 г). Под барбамиловым наркозом (80 мг/кг) крысам в яремную вену вводили 100 мкг активатора на 1 кг массы тела в 0,5 мл физиологического раствора. Контрольным животным вводили только физиологический раствор. Кровь для исследования брали из яремной вены с 0,11 М раствором цитрата натрия в отношении 9 : 1 до введения активатора и через 1, 10, 30, 60 и 90 мин после введения. В пробах крови определяли АЧТВ и тромбиновое время по общепринятым методам, активность фактора V одностадийным методом с плазмой, дефицитной по фактору V («Dade», Швейцария). Активность активаторов плазминогена определяли по методу [3].

Антитромботическое действие активатора протеина С исследовали в экспериментах на крысах, провоцируя тромбообразование введением тромбопластина. Под барбамиловым наркозом 10 крысам массой тела 120—150 г внутривенно вводили 100 мкг/кг активатора, а через 1 мин — летальную дозу раствора тромбопластина (1,2 мл с активностью 22 с). Контрольным животным (10 крыс) вместо активатора до введения тромбопластина вводили физиологический раствор. Регистрировали количество летальных исходов в опыте.

Результаты и обсуждение

Исследовали влияние активатора протеина С в широком диапазоне концентраций на состояние системы свертывания крови in vitro.

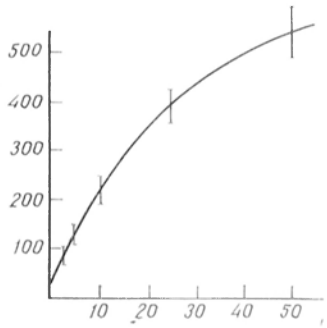

Рис. 1. Зависимость АЧТВ плазмы крови крысы от концентрации активатора протеина С, инкубированного с плазмой.

По оси абсцисс — концентрация активатора, мкг/мл; по оси ординат — АЧТВ, с.

б — зависимость АЧТВ плазмы крови человека от концентрации активатора, инкубированного с протеином С из крови быка и добавленного к исследуемой плазме.

По оси абсцисс — концентрация активатора, мкг/мл; по оси ординат — АЧТВ, с.

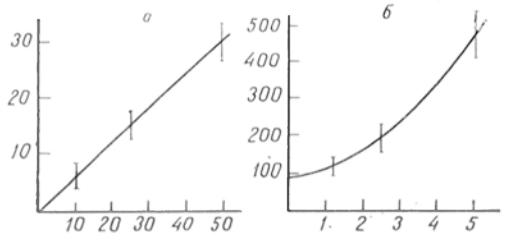

Рис. 2*а* — зависимость эстеразной активности активированного протеина С из крови быка от концентрации активатора, инкубируемого с раствором протеина С.

По оси абсцисс — концентрация активатора, мкг/мл; по оси ординат — эстеразная активность активированного протеина С, $мA_{253}$/мин.

Из рис. 1 видно, что активатор протеина С в концентрации от 2,5 до 50 мкг/мл вызывал дозозависимое удлинение АЧТВ плазмы крови крысы. Этот эффект, по-видимому, обусловлен активацией протеина С плазмы. Действительно, из рис. 2, *а* и *б* видно, что активатор протеина С при инкубации с протеином С из плазмы крови быка в концентрации 300 мкг/мл приводил к дозозависимой активации протеина С, которую регистрировали по появлению эстеразной активности активированного протеина С и по способности активированного протеина С удлинять АЧТВ плазмы крови человека.

Доказательством прямого действия активатора на протеин С служит электрофоретический анализ продуктов реакции активатора протеина С с протеином С. Из рис. 3 видно, что активатор протеина С при инкубации с протеином С в 0,05 М трис-HCl-буфере pH 7,5 при 37 °С вызывал ограниченный протеолиз протеина С и появление продукта с молекулярной массой 60 кД, который идентифицирован как активированный протеин С при сравнении его электрофоретической подвижности с подвижностью активированного протеина С, полученного при активации протеина С эндогенным активатором тромбином. Анализ продуктов гидролиза протеина С активатором показал, что в течение первых 5 мин инкубации активируется большая часть протеина С; к 30-й минуте активация практически завершается. При 60-минутной инкубации протеина С с активатором не наблюдали появление низкомолекулярных продуктов. Можно полагать, что деградации активированного протеина С не происходит, и активатор вызывает только ограниченный протеолиз протеина С по связи Arg—14—Leu—15, как и в случае протеолиза протеина С тромбином. Отсутствие тромбина среди продуктов протеолиза свидетельствует, что протромбин, присутствующий в качестве примеси в препарате протеина С, протеолизу активатором не подвергается.

При исследовании влияния активатора на другие белки плазмы крови установлено, что активатор протеина С в концентрации 250 мкг/мл не активирует и не инактивирует факторы V и VIII (см. раздел «Методы») плазмы, не проявляет способности свертывать 0,3 % раствор фибриногена и плазму крови, не вызывает лизис стабилизированного фибрина и не активирует плазминоген при исследовании по методу [3]. Вместе с тем в этой же концентрации активатор расщепляет 1600 мкмоль протеина С на 1 мг активатора.

На основании данных, полученных in vitro, можно полагать, что активатор достаточно специфично активирует протеин С.

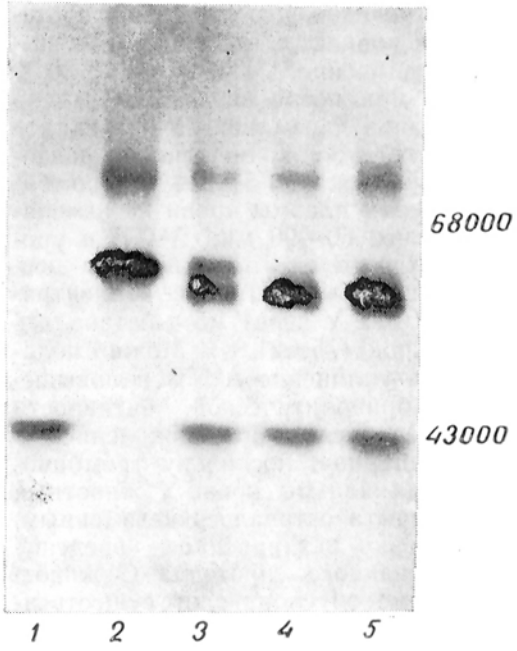

Рис. 3. Электрофоретический анализ продуктов активации протеина С из крови быка активатором.

1 — активатор; *2* — протеин С; *3, 4, 5* — инкубация протеина С с активатором в течение 5, 30 и 60 мин соответственно.

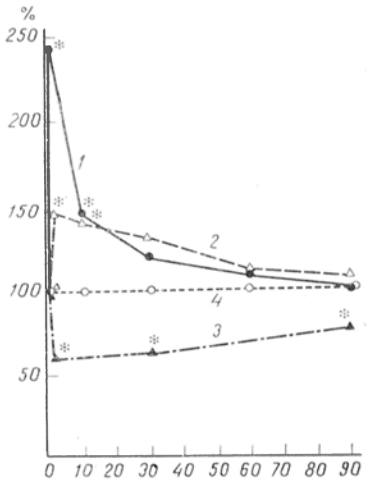

Рис. 4. Динамика изменений АЧТВ, уровня активаторов плазминогена, активности фактора V и тромбинового времени при внутривенном введении крысам активатора протеина С.

По оси абсцисс — время, мин; по оси ординат — изменение в процентах от исходного уровня АЧТВ *(1)*, уровня активаторов плазминогена *(2)*, активности фактора V *(3)* и тромбинового времени *(4)*. Звездочка — $p<0{,}01$.

В следующей серии экспериментов исследовали влияние активатора протеина С на состояние системы свертывания крови при его внутривенном введении здоровым животным (рис. 4). Установлено, что активатор протеина С в концентрации 100 мкг/кг вызывал удлинение АЧТВ до 242±80 % через 1 мин после введения; уровень активаторов плазминогена повышался до 145±29 %, а концентрация фактора V снижалась до 57±14 %. Тромбиновое время плазмы крови не изменялось. Через 60—90 мин АЧТВ и уровень активаторов плазминогена возвращались к исходным, а концентрация фактора V через 1,5 ч оставалась пониженной (75±21 %). Можно полагать, что удлинение АЧТВ и повышение фибринолитической активности крови не обусловлены появлением в крови гепарина, поскольку тромбиновое время плазмы крови у животных в ходе опыта оставалось неизменным.

Поскольку внутривенное введение активированного протеина С животным также обусловливает существенное удлинение АЧТВ, снижение активности фактора V и повышение уровня активаторов плазминогена [1], т. е. результаты, качественно сходные с полученными при введении активатора протеина С, и на основании приведенных выше результатов исследований in vitro мы полагаем, что введенный животным активатор активирует протеин С, а образующийся активированный протеин С определяет снижение прокоагулянтного и повышение фибринолитического потенциала крови.

Учитывая высокий антикоагулянтный эффект активатора протеина С, мы предположили, что он будет оказывать антитромботическое действие в экспериментах по индукции тромбообразования введением животным тромбопластина. В следующей серии опытов крысам на фоне блокады функции противосвертывающей системы наркозом [2] вводили 100 мкг/кг активатора протеина С, а через 1 мин — 1,2 мл раствора тромбопластина. Контрольным животным вместо активатора вводили физиологический раствор. Летальность в контрольной группе составила 100 %, тогда как в опытной погибло только 1 животное из 10. Эти результаты можно объяснить, исходя из предположения, что исследуемый фактор активирует протеин С, который, во-первых, инактивирует факторы V и VIII и тем самым тормозит тромбинообразование, вызванное введением тромбопластина, и, во-вторых, усиливает фибриолиз, повышая в крови уровень активаторов плазминогена.

Таким образом, внутривенное введение активатора протеина С крысам приводит к снижению прокоагулянтной и повышению фибринолитической активности крови и предотвращает экспериментальное тромбообразование при введении тромбопластина.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Коган А. Е., Струкова С. М.* // Бюл. экспер. биол. — 1989. — № 1. — С. 3—5.
2. *Кудряшов Б. А.* Биологические проблемы регуляции жидкого состояния крови и ее свертывания. — М., 1975.
3. *Astrup T., Müllertz S.* // Arch. Biochem. — 1952. — Vol. 40. — P. 346—351.
4. *Comp P. C.* // Semin. Thrombos. Hemostas. — 1984. — Vol.10. — P. 149—153.
5. *Esmon C. T., Owen W. G.* // Proc. nat. Acad. Sci. USA. — 1981. — Vol. 78. — P. 2249—2252.
6. *Griffin J. H., Evatt B., Zimmerman T. S.* et al. // J. clin. Invest. — 1981. — Vol. 68. — P. 1370.
7. *Kisiel W., Canfield W. M., Ericsson L. H., Davie E. W.* // Biochemistry (Wash.). — 1977. — Vol. 16. — P. 5824—5831.
8. *Laemmly U. K.* // Nature. — 1970. — Vol. 227. — P. 680—685.
9. *Marlar R. A., Kleiss A. J., Griffin J. H.* // Blood. — 1982. — Vol. 59. — P. 1067.

10. *Rabinger-Fasching J., Lechner K., Niessner H.* et al. // Thrombos. Haemostas. — 1985. — Vol. 53. — P. 5—7.
11. *Stenflo J.* // J. biol. Chem. — 1976. — Vol. 251. — P. 355—363.
12. *Stocker K., Fischer H., Meier J.* et al. // Toxicon. — 1987.— Vol. 25. — P. 239—252.
13. *Vigano S., Mannucci P. M., D'Angelo A.* et al. // Thrombos. Haemostas. — 1984. — Vol. 52. — P. 263—266.

Поступила 20.07.88

ANTITHROMBOTIC EFFECT OF PROTEIN C ACTIVATOR FROM SNAKE VENOM

S. M. Strukova, A. E. Kogan, A. A. Tara, A. A. Aaviksaar

Biological Faculty, M. V. Lomonosov State University Moscow

Influence of the protein C activator from snake venom on blood coagulation was studied. Incubation of different concentrations of the activator with rat blood plasma resulted in a dose-dependent prolongation of the activated partial thromboplastin time (APTT). Cleavage of the protein C to the active form was detected by electrophoresis. Intravenous administration of the activator (100 mg/kg) into rats led to prolongation of APTT to 242±80 %, to increase in the plasminogen activator level to 145±29 % and to decrease in the factor V activity to 57±14 %. When thrombosis was induced by means of administration of the thromboplastin lethal dose, pretreatment with the activator prevented animal death in 90 % of cases. The effects of the activator observed appear to occur via transformation of the endogenous protein C into its active form.

УДК 616-008.939.52-055.5/.7-079.4-073.916

В. С. Ахунов, К. Д. Краснопольская, Т. В. Миренбург

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ НАГРУЗОЧНЫХ ТЕСТОВ С ПОМОЩЬЮ МЕЧЕНОГО GM_1-ГАНГЛИОЗИДА ДЛЯ ДИФФЕРЕНЦИАЛЬНОЙ ДИАГНОСТИКИ GM_1-ГАНГЛИОЗИДОЗА

Институт медицинской генетики АМН СССР, Москва

GM_1-ганглиозидозы относятся к классу наследственных лизосомных болезней накопления, для которых характерны выраженная генетическая гетерогенность и клинический полиморфизм [7, 9]. В пределах этой нозологической единицы, которая может быть точно диагностирована только по определению активности мутантного фермента β-D-галактозидазы (КФ 3.2.1.23), вычленяют инфантильные, ювенильные и взрослые формы, принципиально различающиеся по тяжести клинического течения [7]. Однако на уровне энзимодиагностики, которая осуществляется с помощью искусственных субстратов (производные п-нитрофенола и 4-метилумбеллиферона), дифференциация этих клинических форм затруднена из-за перекрывания уровней активности остаточного фермента [9]. Это перекрывание биохимических фенотипов затрудняет прогноз заболевания и особенно осложняет дородовую диагностику — единственный эффективный метод профилактики некурабельных сублетальных форм GM_1-ганглиозидоза. Для дифференциации биохимических фенотипов GM_1-ганглиозидоза нами разработан нагрузочный тест с ^{3}H-GM_1 на культурах фибробластов больных, позволяющий оценивать функциональную активность мутантной β-D-галактозидазы. Ранее аналогичный методический поход был разработан нами и применен для генетически гетерогенной группы GM_2-ганглиозидозов.

Методика

Фибробласты от больных и здоровых лиц культивировали стандартными методами [2]. Одна из культур от больного была получена из клеточного банка Института медицинской генетики АМН СССР от ст. научн. сотрудника В. И. Кухаренко.

Выделение GM_1 осуществляли из мозга человека, погибшего от травмы, через 7 ч после наступления смерти. Начальные стадии выделения общих ганглиозидов мозга (ОГМ) описаны нами ранее [1]. Водный раствор ОГМ, полученный после очистки на колонке с активированным силикагелем, подвергали метанолизу для удаления фосфолипидов [5]. Полученный препарат трижды экстрагировали равным объемом н-гексана, водную фазу с ОГМ диализовали 48 ч при 4 °С против дистиллированной воды и лиофилизировали. Десиалирование проводили с помощью нейраминидазы, вводя в инкубационную смесь 8 мг/мл лиофилизированных ОГМ, растворенных в 10 мМ Na-ацетатном буфере (pH 5,6) и 0,026 ед/мл нейраминидазы из нехолерных вибрионов (производство Горьковского НИИ эпидемиологии и микробиологии). Инкубацию проводили 16 ч при 37 °С, после чего инкубационную смесь замораживали, лиофилизировали и осадок, соответствующий 2 мг исходного препарата ОГМ, суспендировали в 1 мл метанола. Суспензию помещали на магнитную мешалку на 1 ч при комнатной температуре,