

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>

ТОМ 35

БЫПУСК 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)

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. // *Toxicol.* — 1987. — Vol. 25. — P. 239—252.
13. Viganò S., Mannucci P. M., D'Angelo A. et al. // *Thrombos. Haemostas.* — 1984. — Vol. 52. — P. 263—266.

Поступила 20.07.88

ANTI-THROMBOTIC 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 $242 \pm 80\%$, to increase in the plasminogen activator level to $145 \pm 29\%$ and to decrease in the factor V activity to $57 \pm 14\%$. 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), вычлениют 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 перекрытия уровней активности остаточного фермента [9]. Это перекрытие биохимических фенотипов затрудняет прогноз заболевания и особенно осложняет родовую диагностику — единственный эффективный метод профилактики некурабельных сублетальных форм GM_1 -ганглиозидоза. Для дифференциации биохимических фенотипов GM_1 -ганглиозидоза нами разработан нагрузочный тест с 3H - GM_1 на культурах фибробластов больных, по-

зволяющий оценивать функциональную активность мутантной β -D-галактозидазы. Ранее аналогичный методический подход 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 n-гексана, водную фазу с ОГМ диализовали 48 ч при $4^\circ C$ против дистиллированной воды и лиофилизировали. Десалирование проводили с помощью нейраминидазы, вводя в инкубационную смесь 8 мг/мл лиофилизированных ОГМ, растворенных в 10 мМ Na-ацетатном буфере (рН 5,6) и 0,026 ед/мл нейраминидазы из нехолерных вибрионов (производство Горьковского НИИ эпидемиологии и микробиологии). Инкубацию проводили 16 ч при $37^\circ C$, 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,

после чего центрифугировали в течение 15 мин при 5000 об/мин и 4 °С. Надосадочную жидкость выпаривали при 30 °С, растворяли в концентрации 10 мг/мл и диализовали против воды 24 ч при 4 °С. Диализат, содержащий ОГМ, подвергали препаративной тонкослойной хроматографии в системе хлороформ — метанол — 0,22 % CaCl₂ (50 : 45 : 10 по объему) на пластинках с силикагелем («Merck», ФРГ) [3]. Выделенный с помощью препаративной хроматографии GM₁ метили с помощью ³H-уксусного ангидрида *in vitro* [4].

Очищенный препарат лизосом получали в полном соответствии с методом [8]. Концентрированный очищенный препарат лизосом из печени беспородных крыс лизировали 10-кратным замораживанием — оттаиванием в 10 mM Na-ацетатном буфере (рН 4,6), полученную суспензию центрифугировали 60 мин при 27 000 об/мин в роторе SW40Ti («Beckman», США). Надосадочную жидкость хранили при —70 °С не более 6 мес.

Для определения локализации метки в ³H-GM₁ 5 мкл водного раствора препарата инкубировали 11 ч с 50 мкл лизата лизосом при 37 °С. Продукты ферментного гидролиза разделяли методом тонкослойной хроматографии на пластинках с силикагелем («Merck») длиной 20 см, нанося на стартовую линию 5 мкл инкубационной смеси и 5 мкл смеси стандартов: GM₁, GM₂, GM₃, галактоза (Гал), N-ацетилгалактозамин (АцГал), N-ацетилнейраминная кислота (АцНК). Смесь стандартов готовили на дистиллированной воде, конечные концентрации стандартов составили (в мг/мл): GM₁ — 4,8, GM₂ — 5,5, GM₃ — 5, Гал — 6,5, АцГал — 9,2, АцНК — 4,2. Хроматографию проводили последовательно в 2 системах растворителей. Первая система была идентична той, которую использовали для разделения ОГМ. Хроматограмму высушивали, отрезали нижнюю часть длиной 1,5 см от старта, содержащую АцНК, и окрашивали резорциновым реактивом [10]. Оставшуюся часть хроматограммы разгоняли во второй системе растворителей. Хроматограмму высушивали и окрашивали антроновым реактивом [11]. Радиоактивность ганглиозидов и продуктов их ферментного гидролиза измеряли, как описано ранее [1].

Нагрузочный тест выполняли на 96-луночных культуральных платах («Flow», Англия). Фибробласты высевали в лунки в ростовой среде по 4·10⁵ клеток на лунку и после образования плотного монослоя среду из лунок отсасывали, клетки промывали 3 раза средой Игла без сыворотки и вводили в каждую лунку 50 мкл среды Игла, содержащей ³H-GM₁ в разных концентрациях. На 1, 4 и 7-й дни после введения в среду ³H-GM₁ среду отсасывали, клетки обрабатывали трипсином, суспендировали, осаждали и измеряли радиоактивность внутриклеточной фракции, как описано ранее [1]. Радиоактивность перцеллюлярной фракции измеряли в надосадочной жидкости, вводя весь объем супернатанта в сцинтилляционный флакон с 10 мл смеси Брея. Концентрацию белка в клеточном гомогенате измеряли по методу Лоури [6].

Результаты и обсуждение

Для разработки функционального нагрузочного теста осуществляли пре-

Характеристика препарата ³H-GM₁ из мозга человека

Параметр	Количественная оценка
Удельная радиоактивность, Ки/ммоль	1,6
Радиохимическая чистота, %	90
Содержание метки, в %:	
в Гал	0,66
в АцГал	41,9
в АцНК	40,7

паративное выделение из мозга человека ганглиозида GM₁, который метили *in vitro* с помощью ³H-уксусного ангидрида. Для определения локализации метки в препарате GM₁ последний обрабатывали лизатом фракции очищенных лизосом, продукты ферментного гидролиза разделяли хроматографически и определяли включение метки во фракции Гал (R_f=0,3), АцГал (R_f=0,4) и АцНК (R_f=0,065). В таблице приведены характеристики полученного нами препарата ³H-GM₁, в котором метка распределялась преимущественно по остаткам АцГал и АцНК, что находится в хорошем соответствии с результатами оригинального метода [4]. Часть метки (<17%), по-видимому, включена в лактозилцерамид (использованный метод не позволял однозначно это идентифицировать).

Возможность поглощения фибробластами ганглиозидов была показана нами ранее. Методика выполнения нагрузочного теста в общем виде также была нами ранее разработана для препарата ОГМ. В данной работе ставились 2 задачи: отработать оптимальные условия для проведения нагрузочного теста с ганглиозидом GM₁ и оценить его разрешающую способность при использовании штаммов фибробластов, полученных от больных с инфантильной и юношеской формами заболевания. Для решения поставленных задач на первом этапе использовали 3 штамма фибробластов, полученных от больной инфантильной формой GM₁-ганглиозидоза (I), от больной с ювенильной формой GM₁-ганглиозидоза (II) и от контроля (III). Активность β-D-галактозидазы в фибробластах I и II составила соответственно 0—8,2 и 149,2 нмоль 4-метилумбеллиферона на 1 мг белка за 1 ч, тогда как в контроле она составляла

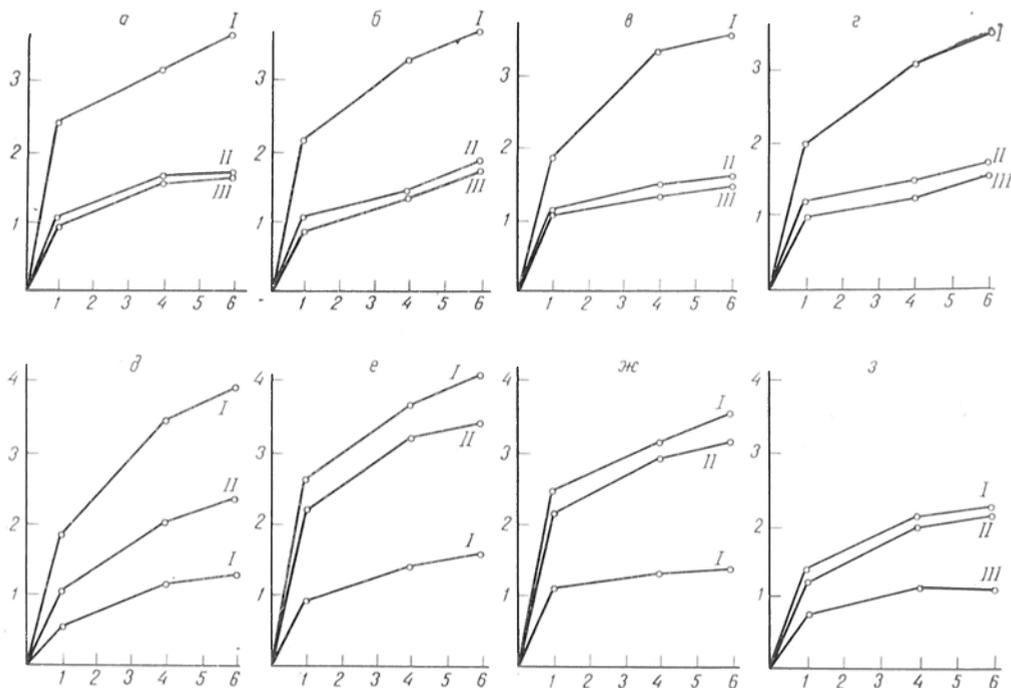


Рис. 1. Нагрузка фибробластов различными концентрациями $^3\text{H-GM}_1$.
a — 0,4 мкг/мл; *б* — 1 мкг/мл; *в* — 2 мкг/мл; *г* — 5 мкг/мл; *д* — 20 мкг/мл; *е* — 100 мкг/мл; *ж* — 200 мкг/мл; *з* — 500 мкг/мл. *I* и *II* — соответственно инфантильная и ювенильная формы GM_1 -ганглиозидоза; *III* — норма. Здесь и на рис. 2: по оси абсциссе — дни; по оси ординат — число распадов в минуту.

469,2 ± 67 нмоль/мг/ч. Активность фермента в лейкоцитах составила 7,8—22,3 нмоль/мг/ч для II и 108,9 ± 8,8 нмоль/мг/ч для III. На рис. 1 представлены результаты нагрузочного теста в зависимости от концентрации $^3\text{H-GM}_1$, введенного в культуральную среду. Во всем исследованном диапазоне концентраций (от 0,5 до 500 мкг/мл) различия в уровнях внутриклеточного накопления $^3\text{H-GM}_1$ между штаммами I и III были очевидными. Это свидетельствует о полной функциональной недостаточности β -D-галактозидазы при инфантильной форме GM_1 -ганглиозидоза. Что же касается штамма II, то различия в накоплении $^3\text{H-GM}_1$ начинают проявляться при концентрации 5 мкг/мл и становятся оптимальными при концентрации меченого ганглиозида 20 мкг/мл. По-видимому, низкие концентрации ганглиозида (до 5 мкг/мл) могут быть гидролизованы остаточной β -D-галактозидазой при ювенильной форме GM_1 -ганглиозидоза и функциональные различия между нормальным и мутантным ферментами недостоверны. При концентрации более 20 мкг/мл мутантная

β -D-галактозидаза не справляется с расщеплением субстрата и уровень накопления $^3\text{H-GM}_1$ в штамме II начинает приближаться к таковому в

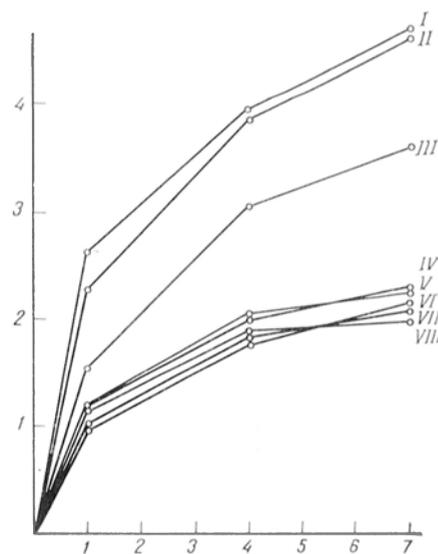


Рис. 2. Нагрузка фибробластов 20 мкг $^3\text{H-GM}_1$ на 1 мл среды.
I и *II* — инфантильная; *III* — ювенильная формы GM_1 -ганглиозидоза; *IV-VIII* — норма.

штамме I, тогда как в нормальных клетках он практически не изменяется. Постепенное снижение кривых накопления $^3\text{H-GM}_1$ во всех клеточных штаммах при концентрации 200 мкг/мл и выше свидетельствует, по-видимому, о цитотоксическом действии высоких концентраций $^3\text{H-GM}_1$.

На рис. 2 приведены результаты нагрузочного теста на более широком спектре штаммов при концентрации $^3\text{H-GM}_1$, равной 20 мкг/мл. Эти результаты свидетельствуют о способности нагрузочного теста к аллельной дифференциации GM_1 -ганглиозидов, что позволяет его использовать в пре- и постнатальной диагностике этой нозологической единицы. Кривые кинетики накопления $^3\text{H-GM}_1$ образуют 3 группы, соответствующие контрольным штаммам ($n=5$), штаммам от больных с инфантильной формой GM_1 -ганглиозидоза ($n=2$) и штамму от больной с ювенильной формой GM_1 -ганглиозидоза.

ЛИТЕРАТУРА

1. Ахунув В. С., Краснопольская К. Д. // *Вопр. мед. химии.* — 1987. — № 4. — С. 115—119.
2. Краснопольская К. Д., Аронович Е. Л., Терехов С. М. // Там же. — 1982. — № 3. — С. 50—55.
3. Ando S., Chang N., Yu R. K. // *Analyt. Biochem.* — 1978. — Vol. 89. — P. 437—450.
4. Higashi H., Basu S. // *Ibid.* — 1982. — Vol. 120. — P. 159—164.

5. Hoffman L. M., Schneck L. // *Gangliosidoses.* — New York, 1975. — P. 223—231.
6. Lowry O. H., Rosebrough N. I., Farr A. L., Randall R. J. // *J. biol. Chem.* — 1951. — Vol. 193. — P. 265—275.
7. O'Brien J. S. // *The Metabolic Basis of Inherited Disease* / Ed. I. B. Stanbury. — New York, 1983. — P. 945—969.
8. Regab H., Beck C., Dillard C., Tappel A. L. // *Biochim. biophys. Acta.* — 1967. — Vol. 148. — P. 501—505.
9. Sandhoff K., Christomanou E. // *Hum. Genet.* — 1979. — Vol. 50. — P. 107—143.
10. Svenneholm L. // *Biochim. biophys. Acta.* — 1957. — Vol. 24. — P. 604—611.
11. Trevelyan W. E., Harrison J. S. // *Biochem. J.* — 1952. — Vol. 50. — P. 298—303.

Поступила 13.07.88

USE OF LOADING TEST INVOLVING LABELLED GM_1 -GANGLIOSIDE IN DIFFERENTIAL DIAGNOSTICS OF GM_1 -GANGLIOSIDOSIS

V. S. Akhunov, K. D. Krasnopol'skaya, T. V. Mi-
renberg

Institute of Medical Genetics, Academy of Medical Sciences of the USSR, Moscow

Kinetics of GM_1 -ganglioside accumulation was studied in fibroblast cultures from patients with various forms of GM_1 -gangliosidosis using the labelled native substrate GM_1 -ganglioside isolated from human brain. A shape of accumulation curves in the plot was shown to depend on GM_1 -ganglioside concentration in a medium in juvenile form of the disease. Use of a number of the fibroblast strains and optimal concentration of GM_1 -ganglioside 20 $\mu\text{g/ml}$ enabled to carry out allele differentiation of the juvenile form of GM_1 -gangliosidosis from infantile and normal forms, thus suggesting that the loading tests could be applied to pre- and postnatal diagnosis of GM_1 -gangliosidosis.

МЕТОДЫ БИОХИМИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ

УДК 616.154:577.175.539]-074:543.544

А. М. Хоха

ОПРЕДЕЛЕНИЕ КОРТИКОСТЕРОНА В ПЛАЗМЕ КРОВИ КРЫС МЕТОДОМ АДСОРБЦИОННОЙ МИКРО-ВЭЖХ

Институт биохимии АН БССР, Гродно

Кортикостерон является важнейшим продуктом секреторной активности коры надпочечников. Его содержание в плазме крови крыс служит надежным критерием функционального состояния

этих эндокринных желез. Наиболее перспективным способом количественного определения кортикостерона в плане быстроты и специфичности анализа является ВЭЖХ [1, 10]. К насто-