

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)

щиты миокарда от влияния избыточных количеств изопротеренола функционируют у 1-месячных крыс, менее эффективно — у 6-месячных и слабо — у 3-месячных.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Геворкян Г. А., Симонян А. А., Восканян Л. О. // Укр. биохим. журн. — 1988. — Т. 60, № 1. — С. 19—23.
2. Данилова К. М. // Арх. пат. — 1961. — № 11. — С. 11—17.
3. Меерсон Ф. З. Патогенез и предупреждение стрессорных и ишемических повреждений сердца. — М., 1984. — С. 33.
4. Меерсон Ф. З. // Физиология адаптационных процессов. — М., 1986. — С. 545.
5. Сობель Б. Е. // Метаболизм миокарда. — М., 1975. — С. 352—372.
6. Чернух А. М., Контева Л. А. // Метаболизм миокарда. — М., 1977. — С. 329—338.
7. Aschenbrenner V., Zak R., Cutilletta A. F., Rabinowitz M. // Amer. J. Physiol. — 1971. — Vol. 221. — P. 1418—1425.
8. Dehlinger J. J., Schimke R. T. // J. biol. Chem. — 1971. — Vol. 246. — P. 2574—2583.
9. Fricke U. // Analyt. Biochem. — 1975. — Vol. 63. — P. 555—558.
10. Galoyan A. A., Kevorkian G. A., Voskanian L. H. et al. // Neurochem. Res. — 1988. — Vol. 13. — P. 435—441.
11. Hoppel C., Cooper C. // Arch. Biochem. — 1969. — Vol. 138. — P. 173—178.
12. Jefferson L. S., Wolpert E. B., Giger K. E., Morgan H. E. // J. biol. Chem. — 1971. — Vol. 246. — P. 2171—2178.
13. Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., Randall R. J. // Ibid. — 1951. — Vol. 193. — P. 265—275.
14. McCaman R. E., McCaman N. M., Hunt J. M., Smith M. S. // J. Neurochem. — 1965. — Vol. 12. — P. 15—23.

15. Milei J., Nunez G. R., Rapaport M. // Cardiology. — 1978. — Vol. 63. — P. 139—151.
16. Mela-Riker L. M., Bukoski R. D. // Ann. Rev. Physiol. — 1985. — Vol. 47. — P. 645—663.
17. Schoenheimer R., Ratner S., Rittenberg D. // J. biol. Chem. — 1939. — Vol. 130. — P. 703—732.
18. Schleyer M., Schmidt B., Neupert W. // Europ. J. Biochem. — 1982. — Col. 125. — P. 109—116.
19. Weber K., Osborn N. // J. biol. Chem. — 1969. — Vol. 244. — P. 4406—4412.
20. Wood W. G., Lindenmayer G. E., Schwartz A. // J. molec. cell. Cardiol. — 1971. — Vol. 3. — P. 127—128.

Поступила 11.11.88

#### SYNTHESIS OF MITOCHONDRIAL PROTEINS IN ISOPROTENERENOL-DERIVED NECROSIS OF RAT MYOCARDIUM

G. A. Kevorkian, A. S. Kananyan, L. O. Voskanian

Institute of Biochemistry, Academy of Sciences of the Armenian SSR, Institute for Postgraduate Training of Physicians, Yerevan

A rate of  $^{14}\text{C}$ -amino acids incorporation into mitochondrial proteins was studied during necrosis of myocardium developed after intraperitoneal injection of (—)isoproterenol to 1-, 3- and 6 months old rats. The rate of label incorporation into the outer membranes fraction was decreased in all the age groups studied, whereas incorporation of the label into the fraction of inner membranes was increased in myocardium of 1 month old rats and decreased in other age groups. Proteins of mitochondrial inner membrane were fractionated by means of electrophoresis in 10 % polyacrylamide gel. In the group of 3 months old animals 23 fractions were detected, while only 18 fractions were found in 1- and 6 months old rats

УДК 616.153.962.4-074

Е. П. Смородин, Х. Э. Арукаэву

#### ВЫДЕЛЕНИЕ $\alpha_2$ -МАКРОГЛОБУЛИНА ПЛАЗМЫ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА КОМБИНАЦИЕЙ МЕТОДОВ ПСЕВДОЛИГАНДНОЙ АФФИННОЙ ХРОМАТОГРАФИИ И ГЕЛЬ-ФИЛЬТРАЦИИ

Институт экспериментальной и клинической медицины Минздрава Эстонской ССР, Таллин

$\alpha_2$ -Макроглобулин ( $\alpha_2$ -МГ) плазмы крови является ингибитором протеаз с широким спектром действия [5]. Для изучения физиологической роли  $\alpha_2$ -МГ важное значение имеет выделение его в чистом виде в нативной форме. Методы выделения  $\alpha_2$ -МГ имеют недостатки: множество этапов и низкий выход [9, 10], инактивация препарата [11], необходимость при-

менения дефицитного иммуносорбента [3], использования плазмы крови с фенолином гаптоглобинов 1—1 [12]. Применение псевдолигандной аффинной хроматографии на Цибаكرون голубой агарозе имеет большие потенциальные возможности для разделения белков крови [7]. Такой метод выделения  $\alpha_2$ -МГ достаточно прост и позволяет избавиться от главных при-

месей — IgM и гаптоглобинов (Hr) [4], однако имеющее место перекрытие зон этих белков с  $\alpha_2$ -МГ снижает общий выход гомогенного препарата  $\alpha_2$ -МГ. В настоящей работе комбинацией методов хроматографии на Цибакрон голубой агарозе [4] и гель-фильтрации на TSK геле TOYOPEARL HW-60 значительно улучшено отделение  $\alpha_2$ -МГ от IgM.

### Методика

Использована Цибакрон голубая агароза F3GA, синтезированная на Опытном заводе биопрепаратов и органического синтеза Института химии АН Эстонской ССР. Для гель-фильтрации применяли TSK-GEL TOYOPEARL HW-60 (TOYO SODA, Япония). Для электрофореза в 5 % полиакриламидном геле (ПААГ) использовали 8 мМ трис-вероналэлектродный буфер, pH 7,5. Состав 5 % разделяющего геля: 0,07 М трис-НСI-буфер, pH 7,5, массовое отношение акриламида к метиленабисакриламиду составляет 25. Состав 2,5 % концентрирующего геля: 0,05 М трис-фосфатный буфер, pH 5,5, отношение акриламида к метиленабисакриламиду 4. Напряженность поля 5--7 В/см. Аппарат для электрофореза АВГЭ-1 (Экспериментальная лаборатория «Хийу калуур», Эстонская ССР). Антипротеазную активность  $\alpha_2$ -МГ определяли по методике, описанной в работе [2]. Количественный анализ  $\alpha_2$ -МГ проводили по методу Лорелла [1].

Процесс выделения  $\alpha_2$ -МГ осуществляли на холоду. Плазму крови (5,5 мл), содержащую цитрат и ингибитор трипсина из сои, обрабатывали солями бария [9]. Перемешивали 1 ч, добавляли  $1/10$  часть 2 % декстрансульфата и  $1/10$  часть 1 М раствора  $\text{CaCl}_2$ , перемешивали в течение 1 ч. Ионы кальция и бария осаждали небольшим избытком 1,5 М раствора  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , осадок отделяли центрифугированием. К надосадочной жидкости добавляли 20 % полиэтиленгликоль (мол. м. 6000) в 0,02 М натрий-фосфатном буфере, pH 7,4, содержащем 0,1 М NaCl, до 6 % насыщения. Перемешивали 0,5 ч, центрифугировали, к надосадочной жидкости добавляли полиэтиленгликоль до насыщения 12 %. Перемешивали 0,5 ч, содержащий  $\alpha_2$ -МГ осадок отделяли центрифугированием и растворяли в 1,2 мл 0,05 М трис-НСI-буфера, pH 8,0. Экстрагировали липиды равным объемом гексана (10 мин при перемешивании), центрифугировали и собирали нижний слой, который диализовали против стартового буфера — 0,05 М ацетата натрия (ионная сила  $\mu=0,05$ ), pH 5,0. Центрифугировали и надосадочную жидкость (1,35 мл) наносили на колонку с Цибакрон голубой агарозой (объем 13 мл). Хроматографию проводили при комнатной температуре. Количество белка на колонку — 40 ед. оптической плотности при 280 нм. Колонку промывали 11 мл стартового буфера, белки элюировали в линейном градиенте NaCl; стартовый буфер — стартовый буфер, содержащий 2 М NaCl (общий объем 30 мл). 2 М NaCl-буфер пропускали дополнительно до значительного снижения оптической плотности элюата.

Кроме того, исследовали распределение

фракций белков при хроматографии на Цибакрон голубой агарозе при pH 8,0. После обработки солями бария 0,4 мл плазмы крови диализовали против 0,05 М трис-НСI-буфера, pH 8,0, наносили на колонку, эквивалентную этим буфером (процесс на холоду). Собирали фракции в трис-буфере, затем фракции белков при элюировании 1 М NaCl, далее фракции при элюировании 0,3 М KSCN (растворы без трис-буфера).

Фракции  $\alpha_2$ -МГ при градиентной элюции 2 М NaCl диализовали против 0,08 М натрий-фосфатного буфера, содержащего 0,32 М NaCl, pH 7,2 и наносили 9 ед. белка (280 нм; объем 0,7 мл) на колонку с гелем TSK HW-60, эквивалентным этим же буфером. Объем геля 200 мл, элюция со скоростью 6 мл/ч (процесс на холоду).

### Результаты и обсуждение

При pH 8,0 в 0,05 М трис-НСI-буфере многие белки плазмы крови человека не связываются с Цибакрон голубой агарозой (рис. 1), хотя и наблюдается некоторое распределение компонентов по колонке. Гель задерживает некоторые иммуноглобулины, основная часть которых элюируется 1 М раствором NaCl. Незначительная часть  $\alpha_2$ -МГ элюируется стартовым буфером, основная часть — 1 М NaCl. Ха-

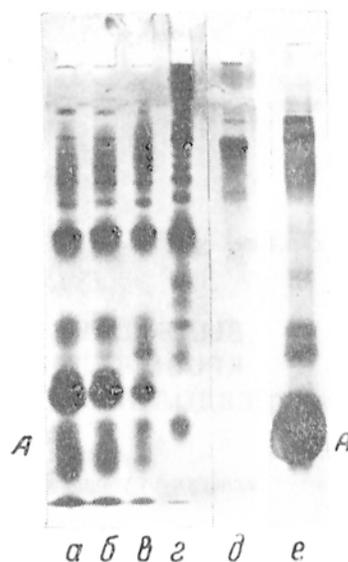


Рис. 1. Электрофорез в ПААГ фракций, полученных хроматографией плазмы крови на Цибакрон голубой агарозе в трис-НСI-буфере, pH 8,0.

a—v — распределение белковых компонентов при элюировании стартовым буфером (a — белки, выходящие с фронтом буфера); e — фракция белков, элюирующихся 1 М раствором NaCl; d — фракция  $\alpha_2$ -МГ ( $\text{F-}\alpha_2$ -МГ), представлена для сравнения; e — фракция белков, элюирующихся 0,3 М раствором KSCN. А — альбумин.

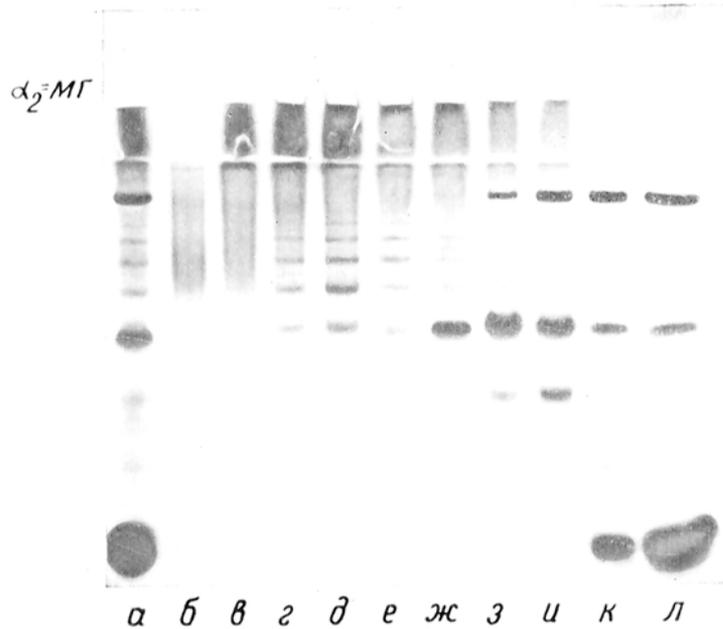


Рис. 3. Электрофорез в ПААГ фракций, полученных хроматографией на Цибакрон голубой агарозе, рН 5,0.

*а* — исходная фракция, обогащенная  $\alpha_2$ -МГ; *б* — фракция № 17 (см. рис. 2); *в* — № 18; *г* — № 19; *д* — № 20–21; *е* — № 22–23; *ж* — № 24–25; *з* — № 26–27; *и* — № 28–29; *к* — № 30–32; *л* — № 33–37.

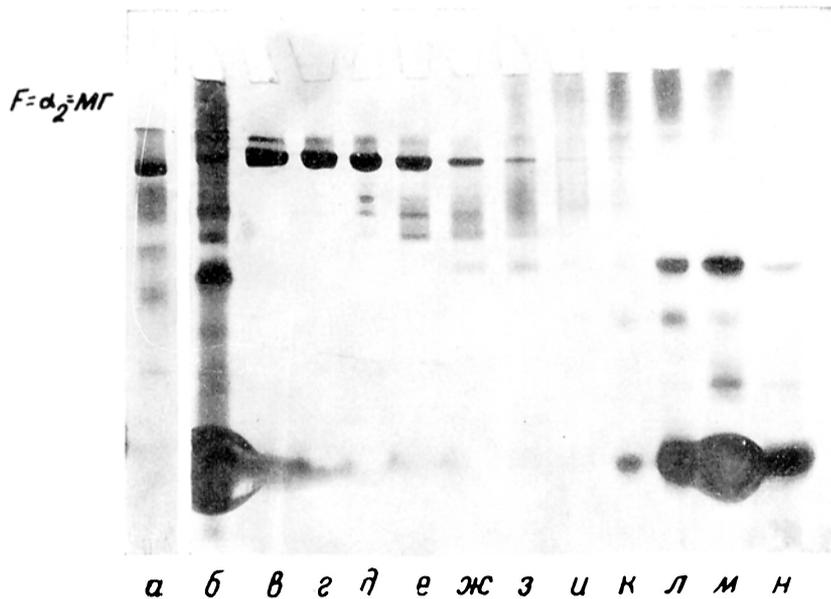


Рис. 5. Электрофорез в ПААГ фракций, полученных гель-фильтрацией на геле TSK HW-60.

*а* —  $\Gamma$ - $\alpha_2$ -мг (неактивная форма); *б* — сыворотка крови человека; *в* — фракция № 30–31; *г* — № 32–33; *д* — № 34–35; *е* — 36–37; *ж* — 38–39; *з* — 40–41; *и* — 42–43; *к* — № 44–45; *л* — № 46–47; *м* — № 48–51; *н* — № 52–54 (см. рис. 4).

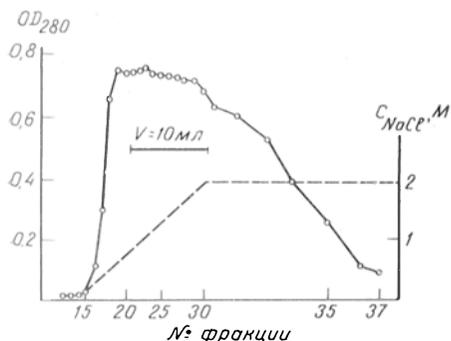


Рис. 2. Хроматография на Цибакрон голубой агарозе фракции белков, полученных осаждением в 12% полиэтиленгликоле (ацетатный буфер, pH 5,0).

Пунктирная линия — концентрация NaCl.

рактерной особенностью элюирования 1 M NaCl в этих условиях является отсутствие фракции альбумина. Часть альбумина элюируется стартовым буфером, основная часть — 0,3 M раствором KSCN. Стартовый буфер элюирует также фракции, имеющие более высокую электрофоретическую подвижность, чем альбумин. В целом увеличение pH и ионной силы элюента ослабляет связывание белков с гелем [7]. Изменяя pH, ионную силу элюента и температуру, можно добиться качественного разделения исследуемых белков. Одним из достоинств Цибакрон голубой агарозы является также высокая емкость связывания белка.

Для усовершенствования метода выделения  $\alpha_2$ -МГ воспроизводили работу [4], в которой не приведены данные анализа фракций методом электрофореза в ПААГ. Хроматограмма обогащенной  $\alpha_2$ -МГ фракции представлена на рис. 2. Полученные данные показывают, что в этих условиях иммуноглобулины и H<sub>2</sub> элюируются раньше и отделяются от  $\alpha_2$ -МГ (рис. 3, см. вклейку). На втором этапе  $\alpha_2$ -МГ отделяют от низкомолекулярных белков [4] на акриламид-агарозном геле АСА-22. Мы вместо АСА-22 использовали гель TSK HW-60 (рис. 4). Получено не только разделение  $\alpha_2$ -МГ и белков меньшего размера, но и дополнительное отделение  $\alpha_2$ -МГ от примеси IgM (рис. 5, см. вклейку). IgM (верхняя диффузная зона) выходит значительно позднее  $\alpha_2$ -МГ, хотя эти белки мало различаются по размеру. Задерживание IgM на колонке можно

объяснить его гидрофобным и электростатическим взаимодействием с гелем. Как известно, TSK-гели не являются идеальными для гель-фильтрации, и фракционирование может дать неожиданные результаты. Так, на TSK-G 4000 SW удается отделить даже нативную форму  $\alpha_2$ -МГ от комплекса  $\alpha_2$ -МГ с протеазама или метиламином, причем диффузная зона комплекса зависит от стехиометрии связывания  $\alpha_2$ -МГ с трипсином [8]. В настоящей работе исходная фракция 30—37 и фракции, полученные после гель-фильтрации, не содержали неактивной формы  $\alpha_2$ -МГ с большей электрофоретической подвижностью  $F = \alpha_2$ -МГ [6] (см. рис. 5). Поэтому неизвестно, разделяются ли нативный  $\alpha_2$ -МГ и F- $\alpha_2$ -МГ на колонке с гелем TSK HW-60. Полученный конечный препарат  $\alpha_2$ -МГ имел высокую антипротеазную активность: удельная активность комплекса с трипсином в присутствии ингибитора трипсина из сои составляла 2,2—2,4 ед/мг (субстрат — этиловый эфир N- $\alpha$ -бензоил-L-аргинина, 0,6 мМ, 25°C).

Такие хроматографические носители, как Цибакрон голубая агароза и TSK-гели, вероятно, пригодны не только для разделения отдельных белков, но и для выявления их микрогетерогенности. Хроматография на геле TSK HW-60 (или использованная в данной работе комбинация) может быть рекомендована также для выде-

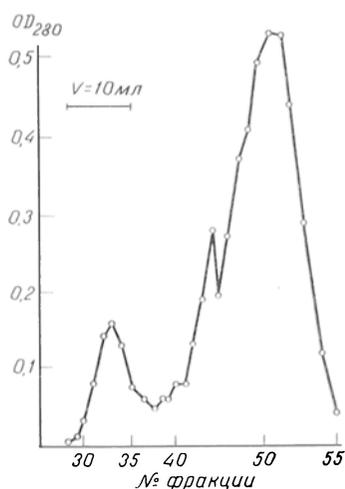


Рис. 4. Гель-фильтрация фракций № 30—37 (см. рис. 2) на геле TSK HW-60. 0,08 M натрий-фосфатный буфер, содержащий 0,32 M NaCl, pH 7,2.

ления IgM. Так, IgM содержит лишь следовые количества  $\alpha_2$ -МГ и  $\beta$ -липопротеида — примесей, затрудняющих очистку IgM (см. рис. 3 и 5).

Таким образом, с помощью комбинации примененных методов достигнуто отделение  $\alpha_2$ -МГ от главных примесей — Нр и IgM.  $\alpha_2$ -МГ получен в функционально активной форме ингибитора протеаз. Псевдолигандная аффинная хроматография и неидеальная гель-фильтрация являются перспективными видами хроматографии с большими потенциальными возможностями.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Бэм Э. // Иммунологические методы: Пер. с нем. — М., 1979. — С. 58—63.
2. Куртенок О. А., Смородин Е. П. // Экспер. онкол. — 1983. — № 2. — С. 55—57.
3. Смородин Е. П. А. с. 1090406, СССР.
4. Arnaud P., Gianazza E. // FEBS Lett. — 1982. — Vol. 137, N 1. — P. 157—161.
5. Barret A. J., Starkey P. M. // Biochem. J. — 1973. — Vol. 133, N 4. — P. 709—724.
6. Barret A. J., Brown M. A., Sayers C. A. // Ibid. — 1979. — Vol. 181, N 2. — P. 401—418.
7. Gianazza E., Arnaud P. // Ibid. — 1982. — Vol. 203. — P. 637—641.

8. Gonias S. L., Roche P. A., Pizzo S. V. // Ibid. — 1986. — Vol. 235. — P. 559—567.
9. Hall P. K., Roberts R. C. // Biochem. J. — 1978. — Vol. 173, N 1. — P. 27—38.
10. Kurecki T., Kress L. F., Laskowski M. // Analyt. Biochem. — 1979. — Vol. 99, N 2. — P. 415—420.
11. McEntire J. E. // J. Immunol. Meth. — 1978. — Vol. 24. — P. 39—45.
12. Virca G. D., Travis J., Hill P. K., Roberts R. C. // Analyt. Biochem. — 1978. — Vol. 89, N 1. — P. 274—278.

Поступила 15.12.88

#### ISOLATION OF $\alpha_2$ -MACROGLOBULIN FROM HUMAN BLOOD PLASMA BY MEANS OF PSEUDOLIGAND AFFINITY CHROMATOGRAPHY COUPLED WITH GEL FILTRATION

E. P. Smorodin, Kh. E. Arukaevu

Institute of Experimental and Clinical Medicine,  
Ministry of Public Health of the Estonian SSR,  
Tallinn

Combination of two procedures — pseudoligand affinity chromatography on Cibacron blue agarose and usual gel filtration on TSK HW-60 enabled to separate successfully blood plasma  $\alpha_2$ -macroglobulin from immunoglobulin M, haptoglobins and low molecular weight proteins. The preparation of  $\alpha_2$ -macroglobulin obtained exhibited high inhibitory activity towards proteases.

УДК 616-008.939.15-39-02:615.917:547.262]-07

Л. Н. Овчинникова, В. З. Горкин

#### ОБ ОСОБЕННОСТЯХ ПЕРЕКИСНОГО ОКИСЛЕНИЯ ЛИПИДОВ ПРИ АЛКОГОЛЬНОЙ ИНТОКСИКАЦИИ

Всесоюзный научный центр медико-биологических проблем наркологии Минздрава СССР, Институт биологической и медицинской химии АМН СССР, Москва

В настоящее время успешно исследуются мембранные механизмы клеточной патологии. Установлено, в частности, существование определенной взаимосвязи между интенсивностью перекисного окисления липидов (ПОЛ) биомембран и особенностями их функционирования в норме и при патологии [2]. Многие авторы наблюдали ПОЛ в печени при метаболизме этанола [22], но данные о сравнительной характеристике процессов ПОЛ в органах человека при алкогольной интоксикации не опубликованы.

Основной целью настоящей работы было сравнительное исследование динамики аскорбатзависимого ПОЛ в тканях печени, легких, почек и сердца человека при острой и хронической алкогольной интоксикации. В ходе исследования мы охарактеризовали так-

же активность ферментов супероксиддисмутазы (СОД), глутатионпероксидазы (ГП) и глутатионтрансферазы (ГТ) как важных компонентов антиоксидантной защитной системы клетки [10].

#### Методика

Навески органов трупов мужчин (25—55 лет), которые при жизни подвергались хронической алкогольной интоксикации и погибли от несчастных случаев (14 человек), от острой алкогольной интоксикации (16 человек), от несчастных случаев или других причин, не связанных со злоупотреблением этанолом (5 человек, контроль), были получены не позже чем через 24 ч после смерти. До момента вскрытия трупы находились в одинаковых условиях морга. Аутопаты были любезно представлены нам канд. мед. наук А. И. Угрюмовым.

Митохондриальные фракции выделяли из 10 % тканевых гомогенатов в 0,25 М сахарозе [17]. Содержание белка определяли колори-