

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

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)

3. Уорд А. М., Уичера Дж. Т. // Иммунохимия в клинической лабораторной практике: Пер. с англ. — М., 1981. — С. 186—195.
4. Bradford M. M. // *Analyt. Biochem.* — 1976. — Vol. 72. — P. 248—251.
5. Crawford J. P. // *Arch. Biochem.* — 1973. — Vol. 156. — P. 215—222.
6. Dietz A. A., Rubinstein A. M., Hodges L. // *Clin. Chem.* — 1976. — Vol. 22. — P. 386—399.
7. Feste A., Hoffman W., Gan J. // *J. Chromatogr.* — 1983. — Vol. 275. — P. 283—293.
8. Grabar P., Williams C. A. Jr. // *Biochim. biophys. Acta.* — 1953. — Vol. 10. — P. 193.
9. Hjelm H., Hjelm K., Sjöquist J. // *FEBS Lett.* — 1972. — Vol. 28. — P. 73—76.
10. Kohler G., Milstein C. // *Nature.* — 1975. — Vol. 256. — P. 495—502.
11. Laemmli O. K. // *Ibid.* — 1970. — Vol. 227. — P. 680—685.
12. Murthy R. J., Merz A. // *FEBS Lett.* — 1973. — Vol. 32. — P. 243—246.
13. Pannell R., Jahson D., Travis J. // *Biochemistry (Wash.)*. — 1974. — Vol. 13. — P. 5439.
14. Travis J., Johnson D. // *Meth. Enzymol.* — 1983. — Vol. 80. — P. 757—763.
15. Vaughan L., Lorier M. A., Carrell R. W. //

Biochim. biophys. Acta. — 1982. — Vol. 701. — P. 339—345.

16. Ward A. M., Underwood J. C. E. // *J. clin. Path.* — 1974. — Vol. 27. — P. 467—472.

Поступила 25.05.88

IMMUNOAFFINITY PURIFICATION OF α_1 -INHIBITOR OF PROTEASES FROM BLOOD PLASMA

C. M. P. Podgarene, M. M. Letskene, M. M. Maurilsas, R. R. Planchyune

Central Research Laboratory, Medical School, Kaunas, Scientific-Industrial Association "Enzyme", Vilnius

A single-step procedure is described for isolation of α_1 -inhibitor of proteases (α_1 -IP) from human blood plasma using affinity chromatography on immunosorbent containing monoclonal antibodies against α_1 -IP. Activity of the α_1 -IP preparation, estimated by means of specific trypsin inhibition, was increased 61.1-fold after the chromatography, with a yield of the end product 20%. The preparation of α_1 -IP obtained exhibited electrophoretic and immunological homogeneity.

УДК 616.151.514-07:616.155.25-008.931:577.152.2

Т. Б. Мареева, Я. М. Соковнина, И. И. Вотрин

ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ И КАТАЛИТИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ГИПОКСАНТИНГУАНИНФОСФОРИБОЗИЛТРАНСФЕРАЗЫ ТРОМБОЦИТОВ ДОНОРОВ И БОЛЬНЫХ ГЕМОФИЛИЕЙ А

НИИ медицинской энзимологии АМН СССР, Москва

Гипоксантингуанинфосфорибозилтрансфераза (ГГФРТ; КФ 2.4.2.8) является ключевым ферментом обмена пуринов, ответственным за реутилизацию пуриновых оснований (гипоксантина, гуанина) в соответствующие нуклеотиды (ИМФ, ГМФ).

Недостаточность ГГФРТ у человека связана с двумя наследственными заболеваниями. У больных с синдромом Леша — Нихена наблюдается полное отсутствие активности ГГФРТ [12], тогда как частичная недостаточность этого фермента сопровождается гиперурикемией и острой формой подагры [8]. Оба заболевания наследуются по рецессивному, X-сцепленному типу.

Различные исследователи изучали остаточную активность ГГФРТ в эритроцитах, культурах фибробластов и лимфобластов больных подагрой и больных с синдромом Леша — Нихена [16, 17]. Отмечена значительная генетическая гетерогенность заболеваний, связанных с недостаточностью

ГГФРТ, что впоследствии было доказано исследованиями на уровне геномной ДНК [14, 17]. В настоящее время изолированы и охарактеризованы многие структурные варианты гена ГГФРТ [17]. Каждый вариант обусловлен, как правило, уникальной и независимой точковой мутацией в локусе ГГФРТ, вызывающей замену аминокислот в молекуле фермента, и характеризуется измененными каталитическими [5, 7, 11, 17] и некоторыми физико-химическими свойствами, таким, как термолабильность [8, 9, 11], ингибирование метаболитами [6, 7, 9], электрофоретическая подвижность [5—7], изоэлектрический профиль [5] и стабильность *in vivo* [4, 9].

Однако как в отечественной, так и в зарубежной литературе данные о свойствах ГГФРТ тромбоцитов в норме и при патологии отсутствуют. В то же время изучение параметров ГГФРТ имеет общеприкладную ценность, а также практическое значение для медицины.

Т а б л и ц а 1
Активность ГГФРТ тромбоцитов [доноров и
больных гемофилией А

Группа исследованных	Удельная актив- ность ГГФРТ, нмоль на 1 мг белка за 1 ч
Больные гемофилией А	78,1±10,7 (n=21)
Доноры	222,0±4,8 (n=19)

Примечание. Здесь и в табл. 2 и 3 в скобках—число больных.

Целью данной работы явилось сравнительное изучение физико-химических и кинетических свойств ГГФРТ тромбоцитов крови человека в норме и при гемофилии А (заболевании, наследуемом по рецессивному, сцепленному с X-хромосомой типу), что необходимо для получения дополнительной информации о возможном молекулярном дефекте ГГФРТ, определяющем дефицит этого фермента при данной патологии.

М е т о д и к а

Активность ГГФРТ в тромбоцитах доноров и больных гемофилией определяли радиоизотопным методом, как описано нами ранее [1]. Тромбоциты выделяли методом дифференциального центрифугирования на фиколле-пак [2]. Кинетические характеристики ГГФРТ изучали методом линейной трансформации уравнения Михаэлиса, предложенным Лайпунивером и Бэрком [3]. Белок определяли по методу Лоури [10].

Р е з у л ь т а т ы и о б с у ж д е н и е

Ранее нами было показано снижение активности ГГФРТ в тромбоцитах

больных гемофилией [1]. Как следует из данных, представленных в табл. 1, активность ГГФРТ при гемофилии А составляет 35 % от активности этого фермента в норме. В данной работе проводили сравнительное изучение физико-химических и кинетических характеристик ГГФРТ тромбоцитов доноров и больных гемофилией А.

В табл. 2 приведены результаты исследования влияния различных метаболитов обмена пуринов — ИМФ, ГМФ, инозина и гипоксантина — на активность ГГФРТ тромбоцитов. При сопоставлении полученных нами данных с результатами, представленными в литературе для ГГФРТ эритроцитов, отмечены некоторые различия в свойствах этих ферментов. Так, гипоксантин в высокой концентрации (500 мкМ) не влияет на скорость ферментативной реакции ГГФРТ тромбоцитов, тогда как заметное субстратное ингибирование было описано для ГГФРТ эритроцитов [6, 7, 9]. Следует также отметить, что фермент тромбоцитов оказался более устойчивым к ингибированию ГМФ (сохраняется 73,8 % активности) по сравнению с ГГФРТ эритроцитов (сохраняется лишь 49 % активности фермента).

Сравнительный анализ результатов исследования физико-химических свойств ГГФРТ тромбоцитов доноров и больных гемофилией выявил существенные отклонения от нормы в свойствах фермента при данном патологическом состоянии. Ряд метаболитов, таких, как ИМФ и ГМФ, подавляет активность ГГФРТ как у доноров, так и у больных гемофилией А. ИМФ в концентрации 100 мкМ оказывает более выраженное ингибирующее

Т а б л и ц а
Влияние метаболитов на активность ГГФРТ тромбоцитов доноров и больных гемофилией А

Группа исследованных	Ингибирование, %					
	ИМФ		ГМФ		инозин	гипоксантин
	100 мкМ	500 мкМ	100 мкМ	500 мкМ	500 мкМ	500 мкМ
Больные гемофилией А:						
№ 1	19,6	89,4	53,0	79,6	0,0	0,0
№ 2	39,4	46,9	33,1	55,4	0,0	0,0
№ 3	30,3	51,1	39,5	67,5	0,0	0,0
№ 4	33,3	71,5	45,9	68,8	0,0	0,0
Доноры (n=4)	52,6±2,6	65,5±1,9	27,2±2,0	72,6±0,5	27,3±3,7	0,0

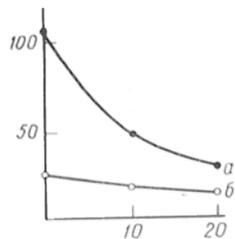


Рис. 1. Термолабильность ГГФРТ тромбоцитов доноров и больных гемофилией А.

По оси абсцисс — время (в мин); по оси ординат — активность фермента (в $\mu\text{моль/ч}$). *a* — ГГФРТ тромбоцитов доноров, *b* — ГГФРТ тромбоцитов больных гемофилией А.

щес действие на ГГФРТ тромбоцитов доноров по сравнению с ферментом больных гемофилией, тогда как ГМФ в той же концентрации ингибирует ГГФРТ больных гемофилией в большей степени, чем фермент доноров. При концентрации нуклеотидов 500 $\mu\text{М}$ различия в степени ингибирования ГГФРТ в норме и при данном заболевании незначительны.

Имеются различия в ингибировании ГГФРТ инозином. Наблюдается отсутствие влияния инозина в концентрации 500 $\mu\text{М}$ на активность фермента больных гемофилией, в то время как ГГФРТ тромбоцитов доноров ингибируется инозином на 27%. Гипоксантин в концентрации 500 $\mu\text{М}$ не влияет на активность ГГФРТ тромбоцитов как доноров, так и больных гемофилией.

При исследовании термолабильности ГГФРТ ферментные препараты инкубировали при 70 °С в течение 10 и 20 мин (рис. 1). Фермент тромбоцитов больных гемофилией оказался

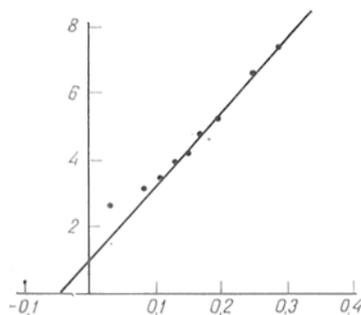


Рис. 2. Зависимость скорости реакции, катализируемой ГГФРТ, от концентрации гипоксантина.

По оси абсцисс — концентрация гипоксантина ($1/S_2$; в $\mu\text{М}^{-1}$); по оси ординат — скорость реакции ($1/V$; в $\mu\text{М/мин}^{-1}$).

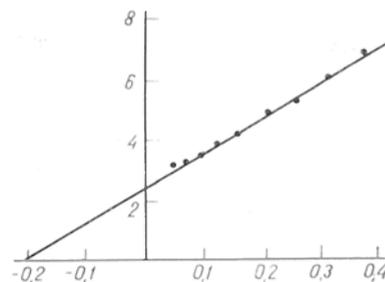


Рис. 3. Зависимость скорости реакции, катализируемой ГГФРТ, от концентрации фосфорибозилпирофосфата.

По оси абсцисс — концентрация фосфорибозилпирофосфата ($1/S_2$; в $\mu\text{М}^{-1}$); по оси ординат — скорость реакции ($1/V$; в $\mu\text{М/мин}^{-1}$).

более стабильным и сохранил в среднем 70% исходной активности по сравнению с нормой (сохраняется только 35% активности фермента).

В следующей серии опытов мы исследовали каталитические свойства ГГФРТ тромбоцитов как в норме, так и при гемофилии А. Полученные зависимости скорости образования ИМФ (V) от концентрации субстратов (S_1, S_2), графически представленные на рис. 2 и 3, указывают на соответствие кинетики реакции, катализируемой ГГФРТ тромбоцитов, классическому уравнению Михаэлиса — Ментен.

Кинетические параметры ГГФРТ тромбоцитов доноров и больных гемофилией представлены в табл. 3.

Впервые с использованием тромбоцитов человека мы провели исследования каталитических параметров ГГФРТ. Из табл. 3 следует, что для гипоксантина K_M и $V_{\text{макс}}$ ГГФРТ равны соответственно $25,0 \pm 2,0 \mu\text{М}$ и $1,25 \pm 0,10 \mu\text{М/мин}$, а для фосфорибозилпирофосфата — $4,5 \pm 0,2 \mu\text{М}$ и $0,42 \mu\text{М/мин}$.

Следует отметить, что ГГФРТ тромбоцитов человека отличается по кинетическим характеристикам от аналогичного фермента эритроцитов [15, 17], но окончательный вывод о тканевой специфичности ГГФРТ может быть сделан только после изучения кинетических свойств фермента с использованием гомогенного препарата.

На основании результатов исследования кинетики ГГФРТ тромбоцитов при гемофилии, приведенных в табл. 3, можно заключить, что по кинетическим характеристикам

Кинетические константы ГГФРТ тромбоцитов в норме и при гемофилии А

Группа исследованных	Гипоксантин		Фосфорибозилпирофосфат	
	K_M , мкМ	V_{\max} , мкМ/мин	K_M , мкМ	V_{\max} , мкМ/мин
Больные гемофилией А:				
№ 1	33,3	1,67	20,0	0,52
№ 2	22,2	0,91	2,6	0,30
№ 3	16,1	0,77	7,1	0,41
№ 4	10,0	0,33	7,7	0,14
Доноры (n=4)	$25,0 \pm 2,0$	$1,25 \pm 1,02$	$4,5 \pm 0,2$	$0,42 \pm 0,01$

ГГФРТ больных гемофилией практически не отличается от фермента доноров, хотя незначительные отклонения в значении каталитических констант наблюдались у 2 больных гемофилией. Так, в случае ГГФРТ тромбоцитов больного № 4 V_{\max} этого фермента для гипоксантина и фосфорибозилпирофосфата была снижена в среднем в 3 раза по сравнению с нормой, а ГГФРТ тромбоцитов больного № 1 характеризовалась значением K_M для фосфорибозилпирофосфата, более высоким (20 мкМ), чем в норме (4,5 мкМ).

До сих пор неясна причина наблюдаемых нами изменений в физико-химических свойствах ГГФРТ, сопровождающихся снижением активности этого фермента при гемофилии. В большинстве случаев, как было описано для ГГФРТ при подагре и синдроме Леша — Нихена, недостаточность активности этого фермента является следствием точковой мутации в структурном гене ГГФРТ [14—16]. Вариабельность экспрессии гена при указанных заболеваниях проявляется в многообразии вариантных форм ГГФРТ. В настоящее время описано около 40 вариантов этого фермента, различающихся между собой по уровню активности и физико-химическим свойствам [13, 17]. Для многих вариантов ГГФРТ отмечено изменение кинетических параметров фермента [15, 17]. Это происходит в том случае, когда мутация затрагивает активный центр молекулы фермента. Отсутствие изменений в каталитических свойствах фермента аналогично описанному нами для тромбоцитов при гемофилии было показано для нескольких вариантов ГГФРТ эритроцитов больных с недостаточностью этого фермента, например: ГГФРТ_{Toronto} [5, 15,

16] и ГГФРТ_{Саре Товн} [13]. В случае ГГФРТ_{Toronto} мутация в структурном гене ГГФРТ проявляется в виде одной замены аминокислот (аргинин — глицин) в молекуле фермента, которая происходит в позиции, удаленной от предлагаемых участков связывания двух субстратов (гипоксантина и фосфорибозилпирофосфата). Вариант ГГФРТ_{Саре Товн} характеризуется нарушением механизма ферментативной реакции, проявляющимся образованием так называемого «мертвого комплекса» фермента с одним из продуктов реакции (пирофосфатом), что и обуславливает низкую активность ГГФРТ в эритроцитах больного, хотя кинетические константы данного фермента остаются неизменными.

Проведенные нами исследования физико-химических и кинетических свойств ГГФРТ тромбоцитов в норме и при гемофилии А косвенно указывают на возможный дефект в структуре этого фермента при данном заболевании.

ЛИТЕРАТУРА

1. Соковина Я. М., Мареева Т. Б., Плющ О. П., Вотрин И. И. // Вопр. мед. химии. — 1985. — № 5. — С. 114—117.
2. Соковина Я. М., Пестина Т. И., Тенцова И. А. и др. // Вести. АМН СССР. — 1984. — № 8. — С. 75—80.
3. Яковлев В. А. Кинетика ферментативного катализа. — М., 1965. — С. 41—45.
4. Arnold W. J., Meade J. C., Kelley W. N. // J. clin. Invest. — 1972. — Vol. 51. — P. 1805—1812.
5. Bakay B., Nyhan W. L., Fawcett N., Kogut M. D. // Biochem. Genet. — 1972. — Vol. 7. — P. 73—85.
6. Fox I. H., Dwosh I. L., Marchant P. J. et al. // J. clin. Invest. — 1975. — Vol. 56. — P. 1239—1249.
7. Gutensohn W., Jahn H. // Europ. clin. Invest. — 1979. — Vol. 9. — P. 43—47.
8. Kelley W. N., Rosenbloom F. M., Hederson J. F., Seegmiller J. E. // Proc. nat. Acad.

- Sci. USA. — 1967. — Vol. 57. — P. 1735—1739.
9. Kelley W. N., Meade J. C. // J. biol. Chem. — 1971. — Vol. 246. — P. 2953—2958.
 10. Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., Randall R. J. // J. biol. Chem. — 1951. — Vol. 193. — P. 265—275.
 11. McDonald J. E., Kelley W. N. // Science. — Vol. 171. — P. 689—681.
 12. Seegmiller J. E., Rosenbloom F. M., Kelley W. N. // Ibid. — 1967. — Vol. 155. — P. 1682—1684.
 13. Steyn L. M., Harley E. H. // J. biol. Chem. — 1984. — Vol. 299. — P. 338—342.
 14. Wilson J. M., Frossard P., Nussbaum R. L. et al. // J. clin. Invest. — 1983. — Vol. 72. — P. 767—772.
 15. Wilson J. M., Young A. B., Kelley W. N. // New Engl. J. Med. — 1983. — Vol. 309. — P. 900—910.
 16. Wilson J. M., Kelley W. N. // J. clin. Invest. — 1983. — Vol. 71. — P. 1331—1335.
 17. Wilson J. M., Stout J. T., Palella T. D. et al. // Ibid. — 1986. — Vol. 77. — P. 188—195.

Поступила 20.06.88

PHYSICO-CHEMICAL AND CATALYTIC PROPERTIES OF HYPOXANTHINE GUANINE PHOSPHORIBOSYL TRANSFERASE IN THROMBOCYTES OF DONORS AND PATIENTS WITH HEMOPHILIA A

T. B. Marceva, Ya. M. Sokovnina, I. I. Votrin

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

Studies of some physico-chemical and catalytic properties of hypoxanthine guanine phosphoribosyl transferase (HGPR) in thrombocytes of donors and patients with hemophilia A showed that kinetic parameters (K_m , V_{max}) of the enzyme were similar both under normal and pathological conditions. However, some differences were detected in thermolability and inhibition of HGPR by purine metabolites: IMP, GMP and inosine. These data suggest that molecular impairment may occur in HGPR under conditions of hemophilia A.

УДК 612.351.11:577.152.313].06:[612.273.2+612.391].086.833

С. Е. Никулина, О. Ю. Крылова, Т. М. Гончаренко, Н. С. Стволинская,
Э. Д. Полякова, Б. Ф. Коровкин

ИЗМЕНЕНИЕ УРОВНЯ цАМФ И АКТИВНОСТИ КИСЛОЙ ФОСФАТАЗЫ В МОНОСЛОЙНОЙ ПЕРВИЧНОЙ КУЛЬТУРЕ ГЕПАТОЦИТОВ НОВОРОЖДЕННЫХ КРЫС В УСЛОВИЯХ АНОКСИИ И СУБСТРАТНОГО ГОЛОДАНИЯ

НИИ медицинской энзимологии АМН СССР, Москва

Несмотря на многочисленные исследования ответной реакции лизосомного аппарата клеток, в том числе и гепатоцитов, на экстремальные воздействия (гипоксию, аноксию, ишемию и т. д.), остается неясным значение циклических нуклеотидов в регуляции этого процесса. Имеются сведения о стабилизирующем действии цАМФ на мембраны лизосом, однако они основаны на экспериментах, выполненных при воздействии на целостный организм [3, 4, 10] или на изолированный орган [12, 23].

В настоящее время все больше исследований проводится на монослойных клеточных культурах [5, 13, 18]. При этом появляется возможность использовать достаточно однородную клеточную популяцию для изучения механизма действия как гормональных факторов, так и других биологически активных соединений. Предварительно нами была охарактеризована модель кислородного и субстратного голодания на первичной культу-

ре гепатоцитов новорожденных крыс. Подобраны такие условия, при которых в гепатоцитах наблюдались значительные, но обратимые изменения ферментативного аппарата лизосом с целью возможной коррекции этих изменений.

Для изучения регуляторного воздействия цАМФ на стабильность лизосомных мембран и как следствие изменения активности лизосомных ферментов можно использовать различные экспериментальные подходы: во-первых, воздействовать на уровень цАМФ, изменяя условия инкубации клеток; во-вторых, искусственно регулируя уровень цАМФ путем введения экзогенного цАМФ.

Целью настоящей работы явилось изучение взаимосвязи между состоянием лизосомного аппарата гепатоцитов и содержанием внутриклеточного цАМФ. Исследовали также возможность коррекции нарушений лизосомного аппарата с помощью цАМФ, заключенного в липосомы.