

Архив журнала

Вопросы медицинской химии

ISSN 0042-8809

1990

Том 36 выпуск 2

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

1990

Volume 36 issue 2

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>

Последний метод был контрольным, он рекомендован как унифицированный [3] и дает хорошую корреляцию с электрофоретическим определением альбумина: 0,91 по данным литературы [4] и 0,94 ($n=33$) по нашим данным. Коэффициент корреляции для пары К-33 — бромкрезоловый зеленый составляет 0,955, а для пары АНС — бромкрезоловый зеленый 0,844. Видно, что в сыворотках с высоким уровнем билирубина АНС дает заниженные результаты, и степень «тушения» не коррелирует с концентрацией билирубина. Напротив, К-33 можно использовать для определения САЧ в сыворотке с любым содержанием билирубина. При чрезвычайно массивной желтухе (4 больных с общим билирубином сыворотки от 338 до 493 мкМ) рекомендуется развести сыворотку в 800 раз, а результат умножить на 2. Подобная процедура при использовании АНС все равно дает существенно заниженные результаты. Кстати сказать, повышенный креатинин (до 966 мкМ) также не влияет на связывание К-33 с САЧ.

Если построить калибровочную кривую по точкам, которые соответствуют сывороткам с нормальными биохимическими показателями, то можно рассчитать ошибку измерения по флуоресценции количества альбумина в группе патологических сывороток. Для К-33 средняя ошибка не превышает 3 %, тогда как для АНС она составляет 21 %.

Методически предлагаемый метод чрезвычайно прост. К 4 мл ацетатного буфера (0,01 М, рН 4,0), содержащего 15 мкМ К-33, добавляют 10 мкл сыворотки и измеряют интенсивность флуоресценции. К-33 достаточно стоек в растворе диметилформамида, но быстро гидролизует в воде. Поэтому лучше использовать 1 мМ раствор зонда в диметилформамиде, не допуская попадания в него воды, а перед употреблением готовить рабочий раствор в ацетатном буфере.

В заключение нужно подчеркнуть, что предлагаемый флуоресцентный метод определения альбумина обладает рядом преимуществ. Он несравнимо проще и быстрее электрофореза в любой модификации, технологичен, может быть автоматизирован. По сравнению с унифицированным методом не требуется импортного реактива бридж-35. К тому же чувствительность флуоресцентного определения на порядок выше, чем при измерении оптической плотности красителя.

Флуоресцентный зонд К-33, как и АНС, может быть использован для определения количества альбумина в сыворотке крови. Использование зонда К-33 (разведение сыворотки 1:400 рН 4,0) дает возможность измерять концентрацию сывороточного альбумина при гипербилирубинемии и уремии, тогда как интенсивность флуоресценции АНС «тушится» в сыворотке крови больных желтухой 3. Предлагаемый метод прост, обладает рядом преимуществ перед другими способами определения альбумина и может быть использован в клинико-лабораторной практике.

ЛИТЕРАТУРА

1. Айдыралиев Р. К., Добрецов Г. Е., Белевич Г. В. и др. // Лаб. дело. — 1987. — № 6. — С. 450—454.
2. Бар-Эрдэнэ О. Влияние среды на функциональные и

- структурные свойства сывороточного альбумина человека: Автореф. дис. ... канд. биол. наук. — Минск, 1985.
3. Лабораторные методы исследования в клинике: Справочник / Под ред. В. В. Меньшикова. — М., 1987. — С. 174—178.
4. Об унификации клинических лабораторных методов исследования. (Приказ МЗ СССР от 21 ноября 1979). — М., 1981.
5. Birkett D. J., Wanwimolruk S. // Protein Binding Drug Transp. — 1986. — Vol. 20. — P. 11—27.
6. Fenske K. J., Muller W. E., Wollert U. // Biochem. Pharmacol. — 1981. — Vol. 30, N 7. — P. 687—692.
7. Ingham K. S. // Arch. Biochem. — 1987. — Vol. 186. — P. 106—113.
8. Klotz I., Burkhart R., Urquhart J. // J. Amer. chem. Soc. — 1952. — Vol. 74, N 1. — P. 202—208.
9. Laurene D. J. R. // Biochem. J. — 1952. — Vol. 51, N 2. — P. 168—180.
10. Rees V. N., Fildes J. E., Laurence D. J. R. // J. clin. Path. — 1954. — Vol. 7, N 4. — P. 336—340.
11. Seki T., Akimoto T., Lijima T. // Colloid. Polimer. Sci. — 1987. — Vol. 265, N 2. — P. 148—154.

Поступила 21.06.88

ESTIMATION OF BLOOD SERUM ALBUMIN IN HYPERBILIRUBINEMIA USING A FLUORESCENT PROCEDURE

Yu. I. Miller, E. G. Yushko, G. E. Dobretsov, B. M. Krasovitsky, R. K. Aidyrallyev

Regional Hospital, Tula, Institute of Physico-Chemical Medicine, Ministry of Public Health of the RSFSR, Moscow, Scientific-Industrial Association "Monocrystal Reagent", Kharkov.

A procedure is developed for estimation of human blood serum albumin in hyperbilirubinemia using a fluorescent probe 9,10-dianiline-2-sulfoanthracene (K-33). Use of the probe N-phenyl-1-amino-8-sulfonaphthalene (ANS) led to underestimation of albumin in hyperbilirubinemia as bilirubin and other inhibitors prevented the ANS binding with blood serum albumin. Substitution of ANS for K-33 enabled to estimate the albumin concentration under conditions of the pathology accompanied by an increase of endogenous ligands content in blood serum. The rate of K-33 (15 mM) fluorescence in blood serum (diluted 400-fold, at pH 4.0) correlated with albumin concentration ($r=0.955$).

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 1990

УДК 616-008.931:577.152.1]-074:543.42.062

В. А. Костюк, А. И. Потапович, Ж. В. Ковалева

ПРОСТОЙ И ЧУВСТВИТЕЛЬНЫЙ МЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ АКТИВНОСТИ СУПЕРОКСИД-ДИСМУТАЗЫ, ОСНОВАННЫЙ НА РЕАКЦИИ ОКИСЛЕНИЯ КВЕРЦЕТИНА

Белорусский государственный университет им. В. И. Ленина, Минск

Супероксиддисмутаза (СОД; КФ 1.15.1.1) является ключевым ферментом антиокислительных систем всех аэробных организмов, катализирующим превращение анион-радикала кислорода (O_2^-) в перекись водорода и молекулярный кислород [4]. Прямое определение активности фермента требует весьма сложного оборудования, отсутствующего в большинстве биохимических лабораторий и медицинских учреждений. Вместе с тем активность СОД является одним из наиболее часто определяемых показателей в различных экспериментальных и клинических исследованиях. В этих случаях используют непрямые методы анализа, основанные на торможении СОД реакций, протекающих с участием O_2^- . В настоя-

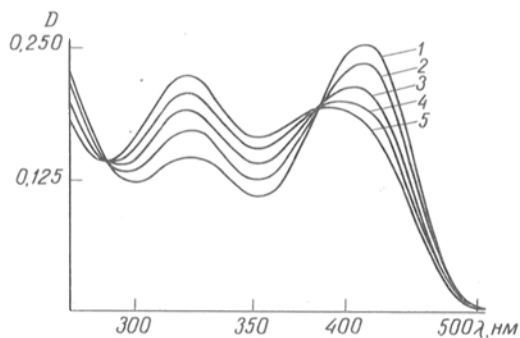


Рис. 1. Динамика спектральных изменений, отражающая процесс аутоокисления кверцетина при pH 10,0 в присутствии ТМЭДА (0,8 мМ) и ЭДТА (0,08 мМ)

1 — спектр поглощения неокисленного кверцетина ($1,4 \cdot 10^{-5}$ М); 2—5 — спектры поглощения кверцетина после 5, 10, 15 и 20 мин окисления соответственно.

щее время известно множество таких реакций, а также ферментных и неферментных систем, используемых для генерации O_2^- [3]. Особый интерес представляют случаи, когда детектором и источником O_2^- является одно и то же вещество, что позволяет упростить процесс анализа и повысить специфичность определения. В то же время такие соединения являются, как правило, нестойкими, и работа с ними требует создания определенных условий [2]. В настоящей статье предлагается спектрофотометрический метод определения активности СОД, основанный на определении степени торможения реакции окисления кверцетина. Метод характеризуется высокой чувствительностью, специфичен, предполагает использование стабильных реактивов.

Методика

Использовали кверцетин («Sigma», США), СОД («Toyobo», Япония) с активностью 3000 ед/мг, каталазу («Serva», ФРГ) с активностью 65 000 ед/мг.

Аутоокисление кверцетина ($1,4$ мкМ) проводили при комнатной температуре в $0,015$ М фосфатном буфере pH 7,8, содержащем $0,08$ мМ этилендиаминтетраацетат (ЭДТА), $0,8$ мМ тетраметилэтилендиамин (ТМЭДА) в конечном объеме $3,5$ мл. Реакцию начинали внесением в среду инкубации кверцетина в $0,1$ мл диметилсульфоксида (ДМСО) или диметилформамида.

Электронные спектры поглощения регистрировали на спектрофотометре («Sresord M-40», ГДР) в 1-сантиметровых кюветах.

Результаты и их обсуждение

Окисление кверцетина в $0,015$ М фосфатном буфере при нейтральном и слабощелочном pH

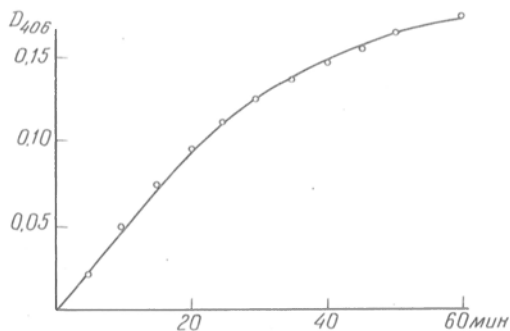


Рис. 2. Кривая, описывающая ход реакции окисления кверцетина ($1,4 \cdot 10^{-5}$ М) во времени.

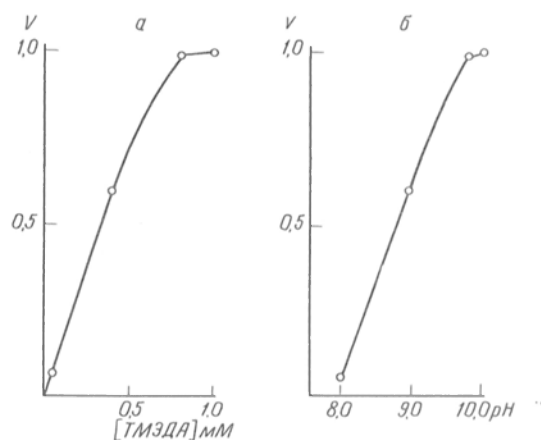


Рис. 3. Влияние различных концентраций ТМЭДА (а) и pH среды инкубации (б) на относительную скорость окисления кверцетина ($1,4 \cdot 10^{-5}$ М)

а — кверцетин окисляли в $0,015$ М фосфатном буфере pH 7,8 в присутствии $0,08$ мМ ЭДТА; б — кверцетин окисляли в присутствии $0,8$ мМ ТМЭДА и $0,08$ мМ ЭДТА в $0,15$, $0,075$, $0,02$ и $0,015$ М фосфатном буфере, чем достигалась конечная pH среды инкубации соответственно 8,0, 9,0, 9,75 и 10,0. По осям ординат — скорость окисления (в усл. единицах)

ингибируется ЭДТА и ускоряется при добавлении ионов двухвалентного железа. Роль O_2^- в этом процессе, по-видимому, незначительна, поскольку СОД не ингибирует окисление кверцетина (результаты не приводятся.)

Добавление в инкубационную среду ТМЭДА (конечная концентрация $0,8$ мМ) сдвигает pH раствора до 10,0. В этих условиях интенсивное окисление кверцетина, сопровождаемое разрушением хромофора с максимумом поглощения при 406 нм и увеличением поглощения при 355 нм, протекает в присутствии $0,08$ мМ ЭДТА (рис. 1). При этом между количеством окисленного кверцетина, оцениваемого по величине оптической плотности при 406 нм, и длительностью реакции сохраняется в течение первых 20 мин линейная зависимость (рис. 2).

Концентрация ТМЭДА $0,8$ мМ является оптимальной для данной реакции, поскольку при более высоких значениях скорость окисления кверцетина не увеличивается, а уменьшение содержания ТМЭДА в среде инкубации приводит к резкому снижению скорости реакции (рис. 3). Данный эффект нельзя объяснить одним лишь изменением pH раствора, поскольку в отсутствие ТМЭДА уве-

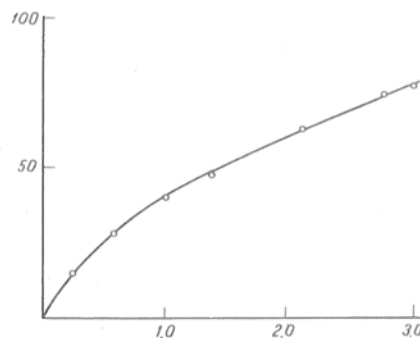


Рис. 4. Зависимость степени ингибирования реакции аутоокисления кверцетина от концентрации СОД.

Каждое значение получено как среднее 3 отдельных экспериментов. По оси абсцисс — концентрация СОД (в нг/мл); по оси ординат — % ингибирования.

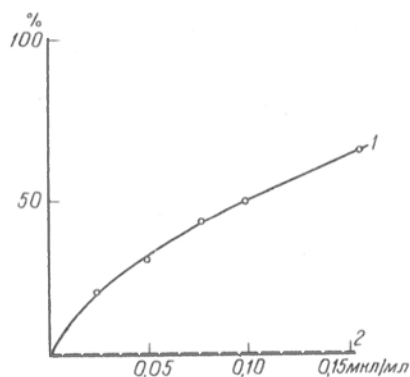


Рис. 5. Зависимость степени ингибирования реакции аутоокисления кверцетина от количества добавленной крови.

1 — нативные образцы крови; 2 — образцы крови, инкубированные 15 мин при 100 °С. Каждое значение получено как среднее 3 отдельных экспериментов. По оси абсцисс — количество крови в пробах (в мкл/мл); по оси ординат — % ингибирования.

личения скорости окисления кверцетина не наблюдалось даже при pH 10,0 (боратный буфер). Вместе с тем действие ТМЭДА на реакцию окисления кверцетина зависит от pH среды инкубации и было максимальным при pH 10,0 (см. рис. 3).

В предыдущих исследованиях [1] было показано, что одним из промежуточных продуктов окисления кверцетина в этих условиях является O_2^- и данная реакция ингибируется СОД. Степень ингибирования (в %) может быть вычислена следующим образом:

$$\% \text{ ингибирования} = \frac{\Delta D_{406}^I - \Delta D_{406}^{II}}{\Delta D_{406}^I} \cdot 100,$$

где ΔD_{406}^I — изменение оптической плотности при 406 нм за 20 мин в контрольной пробе, без СОД; ΔD_{406}^{II} — изменение оптической плотности при 406 нм за 20 мин в опытной пробе, содержащей СОД.

Зависимость степени ингибирования реакции окисления кверцетина от концентрации СОД представляет собой монотонно возрастающую кривую (рис. 4).

В принципе любая реакция, ингибируемая СОД, может быть использована для определения активности фермента. Однако практический интерес представляют наиболее чувствительные к действию СОД реакции. Чувствительность реакции можно количественно охарактеризовать величиной I_{50} , соответствующей концентрации фермента, при которой окисление или восстановление индикаторного субстрата ингибируется на 50 %. Величина I_{50} для окисления кверцетина составляет 1,5 нг/мл очищенного фермента, что значительно меньше, чем для других описанных в литературе реакций, в частности аутоокисления адреналина [5] и НАД · Н [6], равных соответственно 50 и 15 нг/мл.

Важным критерием при выборе той или иной реакции для определения активности СОД является ее специфичность. В связи с этим мы исследовали влияние на процесс аутоокисления кверцетина ловушек других активных форм кислорода: азид натрия, каталазы и аскорбиновой кислоты. Установлено, что ни азид натрия в диапазоне концентраций 6 — 60 мМ, ни каталаза (0,2—20 мкг/мл) не оказывали ингибирующего действия на окисление кверцетина. В то же время ас-

корбиновая кислота ингибировала эту реакцию на 100, 80 и 45 % при концентрациях в среде инкубации соответственно 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} М, что соответствовало концентрациям $3 \cdot 10^{-3}$, $3 \cdot 10^{-4}$, $3 \cdot 10^{-5}$ М в анализируемых пробах. При концентрациях аскорбиновой кислоты в анализируемых пробах меньше $0,5 \cdot 10^{-5}$ М она не влияла на аутоокисление кверцетина.

Таким образом, реакция окисления кверцетина при pH 10,0 в присутствии ТМЭДА является достаточно специфичным и чувствительным индикатором СОД.

Реакция аутоокисления кверцетина была использована нами для определения активности СОД в крови здоровых доноров, гомогенатах печени и мозга крыс, синовиальной жидкости и плазме крови больных ревматоидным артритом. Анализ проводили, как и в случае с очищенной СОД. Разведенные соответствующим образом образцы крови и гомогената мозга вносили в объеме 0,1 мл, гомогената печени — 0,05 мл, синовиальной жидкости — 0,2 мл.

На рис. 5 приведена зависимость степени ингибирования реакции аутоокисления кверцетина от количества крови в пробе. Она представляет собой монотонно возрастающую кривую, идентичную приведенной на рис. 4 для очищенного фермента. Это значит, что последняя может быть использована в качестве калибровочного графика при количественном определении СОД в биологическом материале. При этом расчеты, выполненные для любого разведения крови, дают одинаковые результаты при степени ингибирования реакции окисления кверцетина в диапазоне от 20 до 70 % (табл. 1).

Результаты определения активности СОД в некоторых тканях и биологических жидкостях, приведенные в табл. 2, нуждаются в следующем пояснении. Гомогенаты тканей, как и кровь, характеризуются высокой активностью СОД и требуют значительного (в 1000 раз) разведения. При этом концентрация эндогенных антиоксидантов, в частности аскорбиновой кислоты, снижается до значений порядка 10^{-8} М [7], при которых, как следует из приведенных выше данных, они не оказывают влияния на реакцию аутоокисления кверцетина. Поэтому для расчета содержания СОД может быть использована приведенная выше формула с учетом выполненных разведений.

В синовиальной жидкости, плазме крови содержание СОД сравнительно невелико; мы разводили их для анализа только в 10 раз. В этих

Таблица 1
Содержание СОД в крови, определяемое при различных разведениях анализируемых образцов

Разведение крови	Количество крови в среде инкубации, мкл/мл	% ингибирования	Содержание СОД в крови, мкг/мл
1:1200	0,025	21,0	16,0
1:600	0,050	32,0	14,5
1:300	0,100	50,5	15,0
1:200	0,155	66,0	15,0

Примечание. Приведенные величины представляют собой средние значения, полученные в 3 независимых определениях.

Содержание СОД в тканях и биологических жидкостях

Объект исследования	Рабочее разведение	Содержание СОД, мкг/мл
Кровь:		
мужчины	1:1000	31,0±2,8 (7)
женщины	1:1000	21,0±1,9 (17)
Плазма	1:10	0,35±0,02
Синовиальная жидкость (больные ревматоидным артритом)	1:10	0,27±0,07 (3)
Кровь крыс*	1:1000	34,5±2,45 (5)
Мозг крыс* (10 % гомогенат)	1:100	52,5±3,8** (6)
Печень крыс* (10 % гомогенат)	1:100	197,0±10,1** (6)

Примечания. Представлены средние арифметические величины ± средние ошибки средних арифметических. В скобках — число опытов. Одна звездочка — самки, две — мкг на 1 г ткани.

случаях даже после кипячения в течение 10—15 мин анализируемые образцы сохраняют некоторую способность ингибировать окисление кверцетина, по-видимому, за счет эндогенных антиоксидантов. Поэтому при определении активности СОД следует использовать следующую формулу:

$$\% \text{ ингибирования} = \frac{\Delta D_{406}^{\text{III}} - \Delta D_{406}^{\text{II}}}{\Delta D_{406}^{\text{I}}} \cdot 100,$$

где $\Delta D_{406}^{\text{I}}$ — изменение оптической плотности при 406 нм за 20 мин в контрольной пробе, без биологического материала;

$\Delta D_{406}^{\text{II}}$ — изменение оптической плотности при 406 нм за 20 мин в пробе, содержащей анализируемый материал; $\Delta D_{406}^{\text{III}}$ — изменение оптической плотности при 406 нм за 20 мин в пробе, содержащей инактивированный образец.

При анализе образцов с большим содержанием балластных белков и низкой активностью СОД для инактивации фермента можно использовать цианид. В этих же случаях анализируемые образцы можно предварительно освободить от низкомолекулярных антиоксидантов путем диализа или на сефадексе G-25.

ЛИТЕРАТУРА

1. Костюк В. А., Потапович А. И. // Кислородные радикалы в химии, биологии и медицине. — Рига, 1988. — С. 45—54.
2. Титовец Э. П., Кошкин В. В. А. с. 855502 СССР.
3. Beyer W. F., Jr., Fridovich I. // *Analyt. Biochem.*—1987.— Vol. 161.— P. 559—566.
4. McCord J. M., Fridovich I. // *J. biol. Chem.*—1969.— Vol. 244.— P. 6049—6055.
5. Misra H. P., Fridovich I. // *Ibid.*—1972.— Vol. 247.— P. 3170—3175.
6. Paoletti F., Aldinucci D., Mocali A., Caparrini A. // *Analyt. Biochem.*—1986.— Vol. 154.— P. 536—541.
7. Wright J. R., Colby H. D., Miles P. R. // *Arch. Biochem.*—1981.— Vol. 206.— P. 296—304.

Поступила 28.09.88

A SIMPLE, SENSITIVE ASSAY FOR DETERMINATION OF SUPEROXIDE DISMUTASE ACTIVITY BASED ON REACTION OF QUERCETIN OXIDATION

V. A. Kostyuk, A. I. Potapovich, Zn. V. Kovaleva

Byelorussian State University, Minsk.

An indirect method for determination of superoxide dismutase (SOD) activity, based on inhibition of quercetin autooxidation,

was developed. The optimal conditions of reaction ensuring high sensitivity of measurement ($I_{50}=1.5 \text{ ng/ml}$) were selected. NaN_3 , catalase and physiological concentrations of ascorbic acid did not interfere with the SOD estimation in blood and tissue homogenates.

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 1990

УДК 615.844.6.07:615.31:547.96

С. Г. Жабин, Н. А. Зорин, С. В. Зайцева

ИММУНОЭЛЕКТРОФОРЕТИЧЕСКАЯ ИДЕНТИФИКАЦИЯ БЕЛКОВ, РАЗДЕЛЕННЫХ МЕТОДАМИ ЗОНАЛЬНОГО ЭЛЕКТРОФЕРЕЗА И ИЗОЭЛЕКТРИЧЕСКОГО ФОКУСИРОВАНИЯ

ЦИИЛ Новокузнецкого института усовершенствования врачей Минздрава СССР

Разделение макромолекул методами зонального электрофореза и изоэлектрического фокусирования (ИЭФ) имеет большое значение при установлении их массы, заряда и конформации [1, 3]. В качестве поддерживающей среды при ИЭФ в самоорганизующихся, амфолитных, и искусственных, борат-полиольных, pH-градиентах часто используется полиакриламидный гель (ПААГ) [1, 2]. Разрешающая способность зонального электрофореза в ПААГ значительно выше, чем в агарозном геле [3]. Однако идентифицировать и количественно оценить большое число белковых фракций, полученных этими методами, не всегда представляется возможным. Эту проблему пытаются решить с помощью блоттинга или иммунофиксации, но оба метода малоприменимы для оценки концентрации белков [15]. Предпринимаются многочисленные попытки приспособить для этой цели перекрестный иммуноэлектрофорез [1, 4, 11], но на стыке агарозного и полиакриламидного гелей постоянно формируются участки неравномерного напряжения из-за различного эндоосмоса сред и возникает ток жидкости. Все это приводит к разделению соприкасающихся поверхностей, высыханию агарозы и искажению иммунопреципитатов. Поиск адекватных сочетаний указанных выше методов является актуальной задачей, послужившей предпосылкой настоящей работы.

Методика

В качестве антигенов выбраны смесь сывороток беременных женщин (III триместр беременности) и сыворотка пуповинной крови. Для иммуноэлектрофореза применялись анти-сыворотка против белков сыворотки крови человека (Горьковский НИИЭМ) и анти-сыворотка против α_1 -фетопroteина (НИИЭМ им. Н. Ф. Гамалеи). Для получения моновалентных антисывороток против ассоциированного с беременностью α_2 -гликопротеина (АБГ), ассоциированного с беременностью протеина А (РАРР-А), α_2 -макроглобулина (α_2 -МГ) и тропобластического β_1 -гликопротеина (ТБГ) высокоочищенными препаратами этих белков внутрикожно иммунизировали кроликов [5]. РАРР-А был выделен из сыворотки ретроплатен-тарной крови с помощью аффинной хроматографии на гепарин-сефарозе CL-4B («Pharmacia», Швеция) по методу Sinosich [13] и затем освобожден от примесей негативной аффинной хроматографией на колонке с цианбромированной агарозой («Кемотекс», СССР) с ковалентно присоединенными антителами к сывороточным белкам человека (Горьковский НИИЭМ). АБГ и ТБГ были выделены из сыворотки крови беременных женщин при помощи сочетания гель-хроматографии и негативной иммунной хроматографии [2]. α_2 -МГ был