

## ТВЕРДОФАЗНЫЙ ИММУНОФЕРМЕНТНЫЙ АНАЛИЗ АПОЛИПОПРОТЕИНОВ А-I И В В МОЧЕ ЛЮДЕЙ С НЕФРОТИЧЕСКИМ СИНДРОМОМ

ПОЛЯКОВ Л.М., ПОТЕРЯЕВА О.Н., ПАНИН Л.Е.

Институт биохимии СО РАМН, г.Новосибирск

Для определения апоА-I и апоВ в моче использован метод тИФА. У здоровых людей в моче отсутствовал апоВ, а апоА-I выявлялся в следовых количествах. У больных с хроническим гломерулонефритом содержание в моче апоА-I в 117 раз превышало содержание данного белка в контрольной группе. У этих больных в моче выявлялся апоВ ( $1528 \pm 315$  мкг/л). Метод тИФА апоА-I и апоВ позволяет судить о тяжести патологического процесса в почках.

**Ключевые слова:** твердофазный иммуноферментный анализ (тИФА), аполипопротеин А-I, аполипопротеин В, нефротический синдром, почки, моча.

**ВВЕДЕНИЕ.** Известно, что за сутки с мочой у здоровых людей экскретируется от 40 до 100 мг белка [1]. Среди белков были обнаружены и аполипопротеины (апо) в составе частиц с плотностью менее 1,24 г/мл [2]. Белки из концентрированной суточной мочи давали преципитацию с антителами к апоА-I, С-II, С-III [3]. АпоВ и апоЕ не были выявлены в моче у здоровых лиц. Glass и сотр. [4] предположили, что апоА-I в составе ЛПВП или "свободный" пул быстро фильтруются в почечных клубочках и затем подвергается эндоцитозу в эпителиальных клетках проксимальных канальцев с последующей деградацией.

Определение низкомолекулярных белков в моче ( $\beta_2$ - и  $\alpha_1$ -микроглобулинов, ретинолсвязывающего белка, мочевого белка-1) является ценным клиническим инструментом для оценки функциональных нарушений почек у взрослых и детей [5]. До недавнего времени определение диагностических белков в моче выполнялось методом радиальной иммунодиффузии. Метод оказался недостаточно чувствительным для их определения, особенно в неконцентрированной моче. Нами для определения аполипопротеинов А-I и В в неконцентрированной моче с диагностической целью использовалась методика твердофазного иммуноферментного анализа (тИФА).

**МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ.** Исследовалась моча контрольной группы лиц (всего 32 человека) без почечной патологии и моча больных с хроническим гломерулонефритом с различной степенью почечной недостаточности. Диагноз был поставлен на основании инструментальных и биохимических методов исследования в городской клинической больнице N 34 г.Новосибирска. Группа больных составила 22 человека, в возрасте от 24 до 65 лет, средний возраст 46 лет. Больные получали консервативное лечение: высококалорийная, низкобелковая диета и различные диуретические средства.

Количественное определение апоА-I в моче выполнялось методом непрямого тИФА [6]. Полистироловые планшеты ("Nunc", Дания) инкубировали в течение ночи при 4°C (или 1 ч при 37°C) со 100 мкл стандартного раствора апоА-I, содержащего 1,2,5,10,20,50,100 нг белка и 100 мкл мочи исследуемого образца в 0,01 М фосфатно-

солевом буфере (ФСБ), содержащем 0,05% Tween-20 (ФСБТ). Незанятые места сорбции блокировали 2% овальбумином. В подготовленные таким образом планшеты добавляли по 100 мкл специфических антител в разведении 1:1000 в 0,01 М ФСБТ. Связавшиеся с апоА-I первые антитела на следующем этапе насыщались вторыми антителами. Для этого использовали козы антигела против иммуноглобулина кролика, меченные пероксидазой ("Sigma", США), которые добавляли в количестве 100 мкл в каждую ячейку (разведение 1:1000 в ФСБТ). Планшеты инкубировали в течение часа при 37°C. После пятикратного отмывания ФСБТ проводили ферментативную реакцию. В ячейки вносили по 200 мкл свежеприготовленного орто-фенилендиамина ("Merk", ФРГ) в концентрации 20 мг/100 мл в 0,1 М фосфатно-цитратном буфере, pH 5,0, содержащем 0,006% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Через 15 минут ферментативную реакцию останавливали добавлением 50 мкл 10 Н H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> и измеряли экстинцию при длине волны 492 нм на многоканальном фотометре "Multiskan Flow" (Англия). В качестве отрицательного контроля принимали значение оптической плотности в ячейках, в которые вместо антигена добавляли по 100 мкл ФСБ.

Для тИФА использовались антигены (аполипопротеины) и антитела, полученные самими авторами. С этой целью ЛПВП и ЛПНП выделяли методом препаративного ультрацентрифугирования в растворах KBr на центрифуге "Beckman L-75" (США). АпоА-I и апоВ очищали методами гельфильтрации и ионообменной хроматографии. Чистоту аполипопротеинов исследовали методом диск-электрофореза [7]. Для получения специфических антител кроликов иммунизировали соответствующими аполипопротеинами по схеме, описанной нами ранее [8]. Гамма-глобулиновую фракцию получали из сыворотки крови трехкратным осаждением 50% (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> с последующим диализом против 0,01 М фосфатного буфера, pH 7,4, содержащего 0,15 М NaCl и 0,01% NaN<sub>3</sub>. Конечный этап очистки антител включал ионообменную хроматографию на DEAE-Сефарозе ("Фармация", Швеция). Идентификацию кроличьих антител к аполипопротеинам человека проводили с помощью двойной радиальной иммунодиффузии [9] и иммуноблоттинга [10].

**РЕЗУЛЬТАТЫ.** Хроматографически очищенный апоА-I человека мигрировал в полиакриламидном геле одной полосой как гомогенный белок с молекулярной массой около 28000 Да (рис.1). На рис.2 представлены результаты хроматографической очистки апоВ. Белок не содержал примесей и мигрировал в геле двойной полосой в виде двух основных форм: В-100 и В-48. Полученные кроличьи антитела к апоА-I человека давали одну полосу преципитации с изолированным апоА-I, ЛПВП и сывороткой человека. Антитела к апоВ человека преципитировали с очищенным апоВ, изолированными ЛПНП человека и сывороткой крови человека.

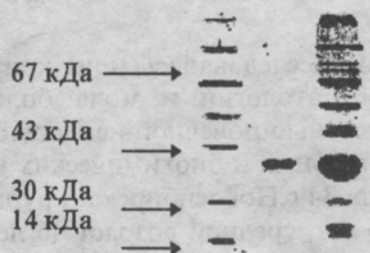


Рисунок 1.

Электрофорез в ПААГ аполипопротеина А-I. 1 - низкомолекулярные белки-стандарты; 2 - суммарные аполипопротеины ЛПВП; 3 - суммарные аполипопротеины ЛПВП низкомолекулярные белки-стандарты.



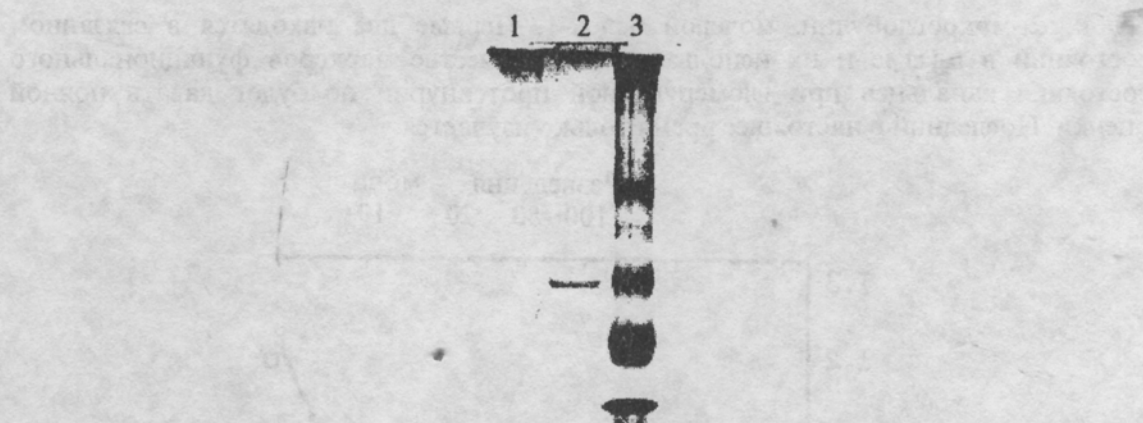


Рисунок 2.

Электрофорез в ПААГ аполипопротеина В. 1 - апоВ; 2 - апоЕ; 3 - суммарные аполипопротеины из ЛП с плотностью меньше 1,21 г/мл.

АпоА-I может попадать в мочу как в составе частиц ЛПВП, так и в виде свободного пула. Не все эпитопы А-I присутствуют на поверхности частиц ЛПВП, часть из них скрыта липидным окружением. Поэтому для более полного обнаружения апоА-I мы применяли температурную обработку мочи при 52°C в течение трех часов, как это было предложено Karlin и сотрудниками [11] для сыворотки крови. На рис.3 представлены кривые титрования стандартного раствора апоА-I, мочи, подвергнутой воздействию температуры и мочи без нагревания в разведениях 5, 10, 20, 50 и 100 раз. Преимущество температурной обработки было очевидным.

Таблица 1. Содержание аполипопротеинов А-I и В в моче здоровых людей и у больных с хроническим гломерулонефритом

Обследуемые группы	АпоА-I (мкг/л)	АпоВ (мкг/л)
Доноры	32,5±3,0	отсутствует
Больные	3848±211***	1528±315***

Примечание: \*\*\* -  $p < 0,001$  по отношению к группе доноров.

Оказалось, что у здоровых людей в моче полностью отсутствовал апоВ, тогда как апоА-I выявлялся лишь в следовых количествах (табл.1). Для обнаружения таких количеств белка мочу брали без разведения. У больных с хроническим гломерулонефритом в моче были обнаружены как апоА-I, так и апоВ. Содержание апоА-I в моче у больных в 117 раз превышало содержание данного белка в контрольной группе лиц. Учитывая высокую чувствительность метода тИФА для определения апоА-I и апоВ мочу уже приходилось разводить в 20 и 5 раз, соответственно.

**ОБСУЖДЕНИЕ.** Известно, что процесс фильтрации белков через мембраны почечных клубочков и их последующая реабсорбция в проксимальных канальцах нефрона определяется размером белковых молекул. Ранее Tomlinson с сотр. [5] было установлено, что определение  $\beta_2$ -микроглобулина в моче может быть клиническим тестом для функциональных нарушений в почечных канальцах у взрослых и детей. Данный белок, подобно другим низкомолекулярным белкам, легко фильтруется, а затем полностью реабсорбируется в проксимальных отделах почечных канальцев. Увеличение его экскреции с мочой является следствием нарушения канальцевой реабсорбции. Однако, показана неустойчивость  $\beta_2$ -микроглобулина в моче с кислым значением pH, что искажает результаты исследования. Поэтому было предложено определение в моче более стабильных белков, таких как ретинолсвязывающий

белок,  $\alpha_1$ -микроглобулин, мочевого белок-1. Первые два находятся в связанном состоянии в плазме и их использование в качестве маркеров функционального состояния канальцев при гломерулярной протеинурии не будет давать полной оценки. Последний в настоящее время только изучается.

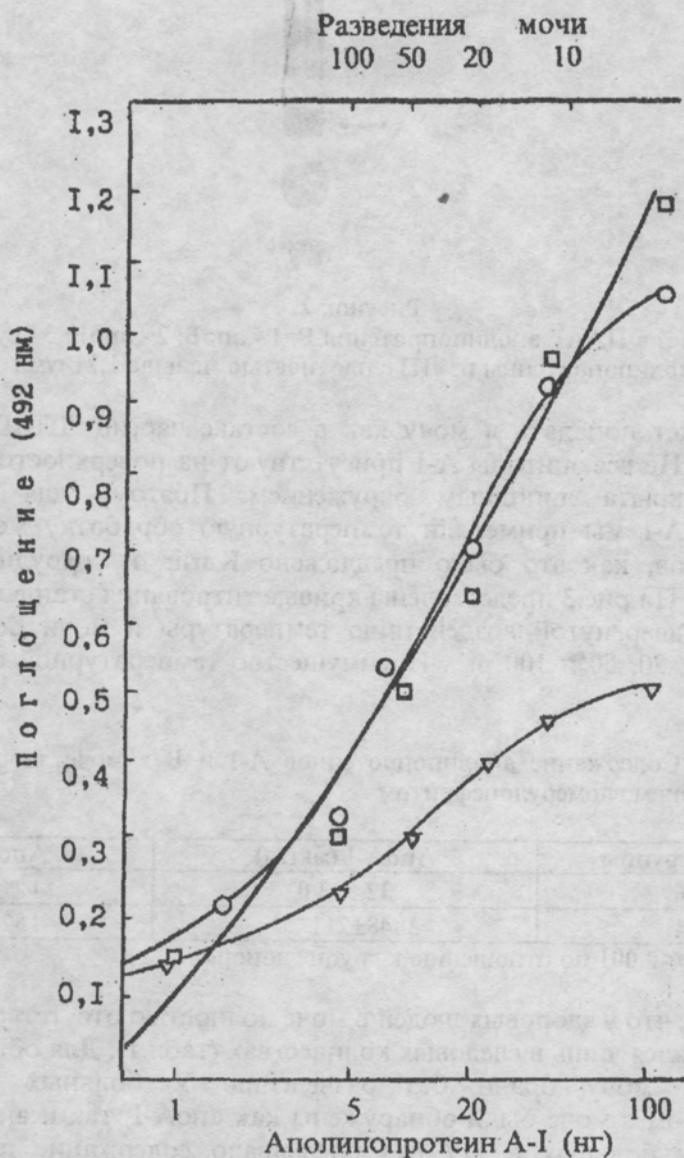


Рисунок 3.

Кривые титрования: стандартного раствора апоА-I (□); мочи, обработанной нагреванием до 52°C (○) и мочи без нагревания (Δ).

АпоА-I - белок с молекулярной массой 28000 Да, стабилен как при кислых, так и при щелочных значениях рН среды. В норме через мембрану почечных клубочков могут проходить белки с молекулярной массой до 45000 Да [12], поэтому апоА-I может легко фильтроваться через клубочковую мембрану. Однако, затем он реабсорбируется в проксимальных канальцах нефрона [4,13]. Моча здоровых людей может содержать следовые количества апоА-I [14]. АпоВ - второй по величине после тиреоглобулина белок с молекулярной массой 550000 Да. Через неповрежденную базальную мембрану почек он пройти не может, что подтверждается отсутствием его в контрольной группе. Однако, изменения состояния почечного барьера (хронический гломерулонефрит) приводят к появлению в моче такого крупного

белка как апоВ. Эти результаты согласуются с литературными, полученными с помощью ракетного иммуноэлектрофореза у больных с нефротическим синдромом [3]. Показано, что концентрация апо А-I в моче у этих больных в 200 раз выше, чем у здоровых. Cassander и сотрудники (3) получили данные о том, что у больных с хронической почечной недостаточностью снижено содержание апоА-I, А-II и Е в сыворотке крови, а количество аполипопротеинов семейства группы С увеличено. Подобные этим изменения аполипопротеинов в сыворотке крови наблюдались и у больных с атеросклеротическими проявлениями.

Метод ТИФА по чувствительности превосходит рутинные методы исследования белков в моче, позволяет обнаруживать даже следовые количества белка, что особенно важно для диагностики почечной патологии на ранних этапах. Мы полагаем, что апоА-I и апоВ можно использовать как альтернативные маркеры для оценки канальцевой дисфункции почек.

### ЛИТЕРАТУРА

1. Henriksen K., Jensen H. (1978) *Acta Med.Scand.* 203.- N.5. 363-367.
2. Segal P., Gidez L.I., Vega G.L., Edelstein D. et al. (1979) *J. Lipid Res.* 20. N.6. 784-788.
3. Atger K., Duval F., Frommherz K., Druke T., Lacour B. (1988) *Atherosclerosis*, 74, N.1-2. 75-83.
4. Glass C.K., Pittman R.C., Keller G.A., Steinberg D. (1983) *J. Biol. Chem.* 258. 7161-7167.
5. Tomlinson P.A., Dalton R.N., Turner C., Chantler C. (1990) *Clin.Chim.Acta.* 192. 99-106
6. Lin R.C. (1986) *Anal.Biochemistry.* 154. N.1. 316-326.
7. Laemmli U.K. (1970). 227. 680-685.
8. Поляков Л.М., Потеряева О.Н., Панин Л.Е. (1991) *Вопр.мед. химии.* 37, 89-92 .
9. Ouchterlony O. (1958) *Prog. Allergy.* 5. 1-77.
10. Tovey E., Baldo A. (1987) *Electrophoresis.* 8, 384-387.
11. Karlin J.B., Juhn D.J., Stars J.I., Scanu A.M., Rubenstein A.H. (1976) *J.Lipid Res.* 7. 30-37.
12. Neary R.H., Gowland E. (1988) *Clin.Chim.Acta.* 171. 239 -246.
13. Dallinga-Thie G.M., Van't Hooft F.M., Van'Tol A. (1986) *Arteriosclerosis.* 6. 277-284.
14. Gomo Z.A.R., Henderson L.O. (1988) *Clin. Chem.* 34. 1781-1786.
15. Cassander M., Ruin G., Gambino R., Alemanno N., Pagano G. (1988) *J. Arteriosclerosis*, 13. 119-124.

Поступила 10. 01. 1998 г.

### ENZYME-LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY FOR APOLIPOPROTEINS A-I AND B IN URINE OF PATIENTS WITH NEPHROTIC SYNDROME

POLYAKOV L.M., POTERYAEVA O.N., PANIN L.E.

Institute of Biochemistry, Siberian Branch of RAMS, Novosibirsk, Russia

Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) has been used for measuring apolipoproteins A-I and B in the urine. ApoB is absent in urine of healthy subjects, and apoA-I is determined in trace quantity. In patients with chronic glomerulonephritis quantity of apoA-I in urine was 117 times as much as in control group. ApoB is present in urine of patients in considerable quantity ( $1528 \pm 315 \mu\text{g/l}$ .) The ELISA method for determining apoA-I and apoB in urine makes it possible to evaluate the gravity of pathological process in kidney.

**Key words:** enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA); apolipoprotein A-I; apolipoprotein B; nephrotic syndrome; kidney; urine.