

УДК 577.15

## РАЗДЕЛЕНИЕ ИЗОФЕРМЕНТОВ КРЕАТИНКИНАЗЫ МОДИФИЦИРОВАННЫМ МЕТОДОМ МЕРКЕРА

З. С. МКРТЧЯН, М. Г. ГАЗАРЯНЦ, Л. С. НЕРСЕСОВА, Ж. И. АКОПЯН

В работе представлены экспериментальные данные об изоферментном составе креатинкиназы из мышечной и мозговой тканей, а также из перитонеальных макрофагов мыши и кролика, полученные модифицированным методом Меркера. Эти результаты позволяют допустить предположение об определенной схожести некоторых физико-химических параметров креатинкиназы перитонеальных макрофагов и фермента мозговой ткани.

Известны три классические формы креатинкиназы (АТФ : креатин—фосфотрансфераза 2.7.3.2.): ММ—характерная для мышечной ткани, МВ—для сердечной мышцы и ВВ—для мозговой ткани. В электрическом поле изофермент 1 (ВВ) обладает наивысшей подвижностью в направлении к аноду, изофермент 3 (ММ) движется к аноду с наименьшей скоростью, изофермент 2 (МВ или ВМ) занимает в этом отношении промежуточное положение.

Разделение изоферментов креатинкиназы проводится в основном следующими методами: электрофорезом в геле агары [1—3], в крахмальном геле [4, 5], в полиакриламидном геле [6].

Меркером предложен новый метод разделения изоферментов креатинкиназы на хроматографической колонке с ДЕАЕ-сефадексом А-50 [7], который сразу получил широкое признание [8, 9] ввиду высокой разрешающей способности и воспроизводимости. Ранее нами было показано наличие креатинкиназы в перитонеальных макрофагах и полиморфоядерных лейкоцитах кролика, мыши и морской свинки [10]. Электрофорез в геле крахмала показал, что креатинкиназа в указанных клетках представлена в форме ВВ. Представляло интерес подтвердить эти данные методом Меркера с тем, чтобы в дальнейшем облегчить идентификацию изоферментов креатинкиназы, а также использовать этот метод в процессе очистки фермента лейкоцитов. В связи с этим метод Меркера был частично модифицирован.

*Материал и методика.* Перитонеальные макрофаги получали по ранее описанному методу [10]. Гомогенизацию мышечной, мозговой тканей и макрофагов проводили в 0,05 М трис-0,1 М NaCl буфере (начальный буфер), рН 8,0, при 4°. Гомогенат центрифугировали при 15000 об/мин в течение 30 мин при температуре 4°. Полученную надосадочную фракцию использовали для хроматографии на микроколонках (0,2×

6 см) с ДЕАЕ-сефадексом А-50 согласно оригинальному методу Меркера. Для препаративного получения изоферментов креатинкиназы метод Меркера был нами частично модифицирован.

Понообменник (0,7 г) набухал в избыточном количестве начального буфера в течение 3,5 часов. После декантации гель переносили в колонку размером 0,9×11 см. Колонку уравнивали пропусканьем двух колоночных объемов начального буфера, затем наносили 6 мл надосадочной фракции центрифугата, с общим содержанием белка, равным 2—5 мг. Колонку промывали тройным объемом начального буфера, рН 8,0. Элюцию проводили ступенчатым градиентом 0,1 М—0,3 М NaCl, забуференным 0,05 М трис-HCl. Фракции собирали в колоночном объеме, равном 6 мл. Содержание белка определяли по методу Лоури [11], активность креатинкиназы—модифицированным методом Эннса и Розенберга, основанным на определении содержания образующегося креатина в реакционной среде [12]. За единицу ферментативной активности принимали то количество фермента, которое способно катализировать образование 1 мкмоль креатина за минуту при 30°.

*Результаты и обсуждение.* Методом Меркера мы исследовали изоферментный состав мышечной и мозговой креатинкиназы, а также креатинкиназы перитонеальных макрофагов мыши и кролика. На первом этапе работы нами был воспроизведен метод Меркера с применением микроколонок. Далее, когда встал вопрос получения больших количеств изоферментов, этот метод был несколько модифицирован. Следует отметить, что разделение изоферментов указанных тканей на микро- и обычных колонках проводилось в одинаковых условиях. Результаты этих опытов представлены на рисунке, из которого видно, что креатинкиназная активность мышечной ткани мыши и кролика (изофермент ММ) обнаруживается в первых трех фракциях (рис., А), а мозговой (изофермент ВВ)—во фракциях 9 и 10 (рис., В). Такое распределение изоферментов соответствует данным, полученным Меркером [7] и другими авторами [8, 9].

Наибольший интерес представляло исследование изоферментного спектра перитонеальных макрофагов. Как видно из рисунка, креатинкиназная активность этих клеток представлена одной формой фермента, элюирующейся в тех же фракциях и элюирующим буфером той же ионной силы, что и креатинкиназная активность мозговой ткани. Результаты хроматографии экстрактов перитонеальных макрофагов кролика совпадают с данными, полученными ранее [10] методом электрофореза в крахмальном геле, что позволяет допустить мысль об определенной схожести некоторых физико-химических параметров креатинкиназы перитонеальных макрофагов и фермента мозговой ткани.

В ходе работы стало очевидным, что при разделении изоферментов на колонке идет и их частичная очистка. В качестве примера приводим данные частичной очистки креатинкиназы перитонеальных макрофагов (таблица).

Как видно из таблицы, при разделении изоферментов креатинкиназы, в данном случае, наблюдается очистка фермента в 6,25 раз, с выходом общей активности порядка 90%.

Таким образом, этот метод может быть использован в дальнейшем как один из этапов очистки креатинкиназы. Кроме того, метод разделе-

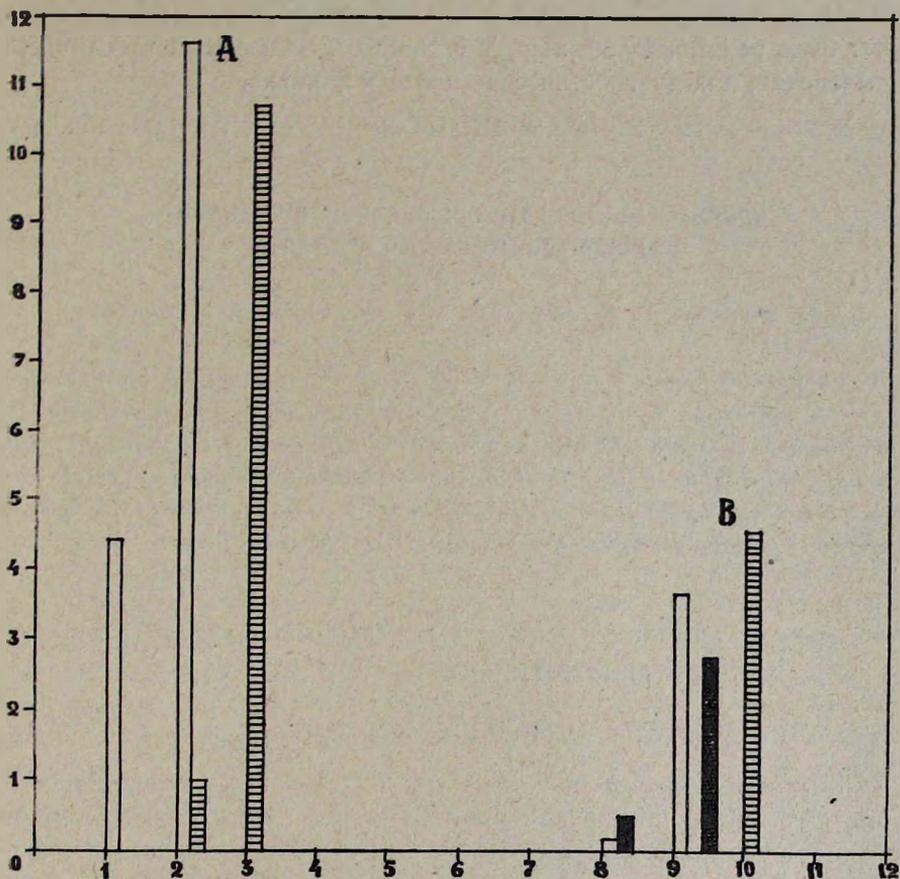


Рис. Разделение изоферментов креатинкиназы. По оси ординат—активность креатинкиназы, мкмоль/мг мин; по оси абсцисс—номера фракций. А—активные по креатинкиназе фракции мышцы □—кролика; ▨—мыши, хроматографированные на колонке с ДЕАЕ-сефадексом А-50, элюированные 0,1 М NaCl на 0,05 М трис-HCl буфере, рН 8,0. В—активные по креатинкиназе фракции мозга □—кролика; ▨—мыши; ■—перитонеальных макрофагов, элюированные 0,3 М NaCl на 0,05 М трис-HCl буфере, рН 7,0.

Таблица

Пример частичной очистки креатинкиназы перитонеальных макрофагов кролика

Стадии очистки	Общий объем, мл	Общий белок, мг	Общая активность, мкмоль/мин	Удельная активность, мкмоль/мг мин	Степень очистки	Выход, %
Экстракт перитонеальных макрофагов кролика	6	5,0	2,20	0,44	1	100
Хроматография на ДЕАЕ-сефадексе А-50	6	0,75	2,06	2,75	6,25	90

ния изоферментов перитонеальных макрофагов на ДЕАЕ сефадексе А-50 может быть рекомендован, наряду с данными об изоферментном спектре сыворотки, для диагностических целей в клинике.

Институт экспериментальной биологии АН АрмССР

Поступило 1.VI 1977 г.

## ԿՐԵԱՏԻՆԿԻՆԱԶԻ ԻԶՈՅԵՐՄԵՆՏՆԵՐԻ ԲԱԺԱՆՈՒՄԸ ՄԵՐԿԵՐԻ ՁԵՎԱՓՈԽՎԱՄ ՄԵԹՈԴՈՎ

Ձ. Ս. ՄԿՐՏԳՅԱՆ, Մ. Գ. ՂԱԶԱՐԳՅԱՆ, Լ. Ս. ՆԵՐՍԵՍՈՎԱ, Ժ. Ի. ՀԱԿՈԲՅԱՆ

Մերկերի ձևափոխված եղանակով DEAE A-50 սեֆադեքսի սյունով անցկացված է մկանային և ուղեղային հյուսվածքների, ինչպես նաև պերիտոնեալ մակրոֆագերի կրեատինկինազի իզոֆերմենտների բաժանում: Յույց է տրրված, որ պերիտոնեալ մակրոֆագերի կրեատինկինազը ներկայացված է ֆերմենտի մեկ ձևով, իր ֆիզիկա-քիմիական որոշ հատկություններով հիշեցնելով ուղեղային հյուսվածքի կրեատինկինազը՝ (BB) իզոֆերմենտը:

## SEPARATION OF CREATINE KINASE ISOENZYMES BY THE MERCER MODIFICATED METHOD

Z. S. MKRTCHYAN, M. G., GASARYANTS, L. S. NFRSESOVA, Z. I. AKOPYAN

The present experimental data about isoenzymes compounds of creatine kinase from muscle and brain tissue and also from peritoneal macrophages of mouse and rabbit have been obtained by modified method of Mercer.

These results allow us to admit a definite likeness between the same physicochemical parameters of creatine kinase of peritoneal macrophages and enzyme of the brain tissue.

## Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Eppenberger H. M., Dawson D. M., Kaplan N. O. JBC, 242, 204, 1967.
2. Ohto X. Shikoku Acta Med., 26, 505, 1970.
3. Somer H., Kontinen A. Clin. Chim. Acta, 40, 133, 1972.
4. Dawson D. M., Eppenberger H. M., Kaplan N. O. JBC, 242, 210, 1967.
5. Kumudavalli J., Watts D. C. Biochem. J., 108, 547, 1968.
6. Саминский Е. М. Физико-химические методы изучения анализа и функционирования биополимеров. М.—Л., 1966.
7. Mercer D. W. Clin. Chem., 20, 1, 36, 1974.
8. Nealon D. A., Henderson A. R. Clin. Chem., 21, 3, 392, 1975.
9. Yasmineh W. G., Hanson N. Q. Clin. Chem., 21, 3, 381, 1975.
10. Нерсесова Л. С., Ашмарин И. П., Лызлова С. Н. Журн. экслер. и клинич. медицины, 16, 1, 61, 1976.
11. Lowry O. H., Rosenbrough N. J., Farz A. L., Rival R. J. J. of Biological Chemistry, 193, 265, 1951.
12. Ennor A. H., Rosenberg H. Biochemical, J., 57, 233, 1964.