

## ИЗМЕНЕНИЯ ЭКСТРАГИРУЕМОСТИ БЕЛКОВ МЕМБРАН ЭРИТРОЦИТОВ КРОВИ ПРИ СЕРДЕЧНОЙ НЕДОСТАТОЧНОСТИ

А.В. КАЛАЧЯН, А.Ш. АБРАМЯН, Г.А. МНАЦАКАНЯН, А.И. ОГАНИСЯН,  
А.А. АРУТЮНЯН, К.Г. КАРАГЕЗЯН

*Институт молекулярной биологии НАН Армении, 375014, Ереван*

Changes in extraction of erythrocytes membrane proteins from patients with the heart blood circulation disorders have been studied by the method of polycordinate extraction and reproduced shifts have been revealed. These data can be implemented in clinical practice as the test-analysis in diagnostic purposes.

### *Белки мембран эритроцитов - сердечная недостаточность*

Исследования последних лет показали, что при разного рода патологиях крови имеют место изменения как в целом структуры мембраны эритроцитов, так и отдельных ее компонентов. Показано, что при хронической сердечной недостаточности и инфаркте миокарда происходит значительное ингибирование ( $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ )-АТФ-азной активности мембраны эритроцитов, а также повышается его чувствительность к перекисному окислению [4, 9, 11, 12], что приводит к "разрыхлению" структуры мембраны. Также установлено, что при гемолитической анемии наблюдается дефицит белка 4.2, являющегося одним из белков, включенных в усиление цитоскелетных мембранных взаимодействий в эритроцитах человека [5]. Однако остается малоизученным вопрос о взаимодействиях чувствительных к патологии белков с остальными мембранными белками.

Предложенный нами метод двухкоординатной экстракции позволяет оценить изменения характера взаимодействия мембранных белков, а также их сродство к структуре мембраны при разного рода патологиях крови. Это даст возможность в дальнейшем применять данный метод для оценки характерных изменений во взаимодействии мембранных белков при конкретной патологии и проводить дифференцированную диагностику. Настоящее исследование является одним из этапов в решении этой задачи.

**Материал и методика.** В работе использовали цитратную венозную эритроцитарную массу здоровых доноров (отмытую от плазмы в НИИ переливания крови МЗ Армении) и кровь больных, находившихся на излечении в НИИ хирургии МЗ РА с диагнозом венозная и артериальная недостаточность.

Выделение отмытых эритроцитов и эритроцитарных телей производили из цитратной венозной донорской эритроцитарной массы и из цельной крови шести больных (по 5-10 мл) по методу [1] с некоторыми модификациями. Исследование характера экстрагируемости белков из мембранного матрикса в двухкомпонентных средах проводили в 16 отдельных пробах. Затем была выбрана резульативная точка экстракции 14:  $\text{NaCl}$ -трисол X-100 (0.7 M  $\text{NaCl}$ ; 0,05% трисол X-100) [2].

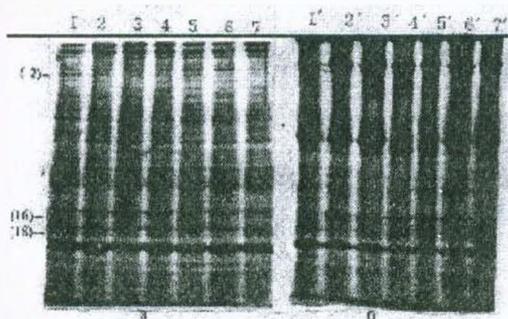
Содержание основных белков в эритроцитарных телях определяли ДСН-гель электрофорезом в полиакриламидном геле согласно методике [6]. ДСН-гель-электрофорез проводили методом Лаэммли [8] в двухступенчатом 3%-ном и 10%-ном полиакриламидном геле (размер разделяющего геля составляет 8 x 15 см, толщина 1мм) и использовали сшивающий агент Silan A-174.

Денситометрирование белковых полос проводили на Ultrascan XL (LKB) при 633

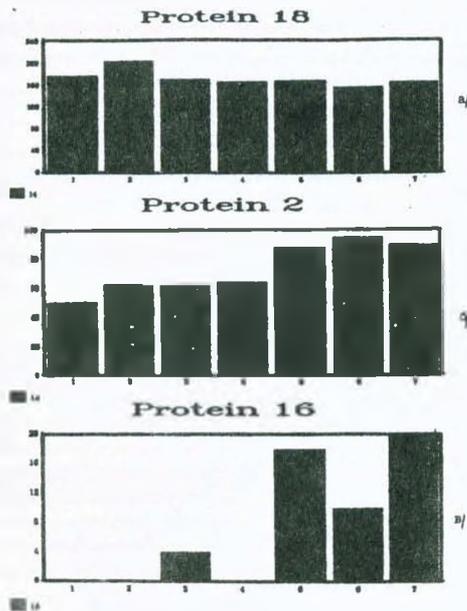
нм. Основные белки мембран эритроцитов человека идентифицированы согласно классификации Стека-Хеста [10, 7].

Для того чтобы в экспериментах исключить наложение систематических ошибок и убедиться в воспроизводимости величины выхода белка были проведены контрольные эксперименты для сравнения повторных выделений плазматических мембран из того же источника, результатов электрофореза одного образца, нанесенного на разные пластинки.

Погрешности не превышали в совокупности 20-25% от среднеарифметического значения параметра.



**Рис. 1.** Электрофореграмма мембранных белков эритроцитов человека, экстрагированных в точках экстракции 14 (рис. 1, а) и 16 (рис. 1, б) системы NaCl - тритон X-100 из: мембран эритроцитов доноров - треки 1,1', мембран эритроцитов больных с венозной недостаточностью - треки 2-4, 2'-4', мембран эритроцитов больных с артериальной недостаточностью - треки 5-7, 5'-7'. Объем наноски образцов 1-7, 1'-7' равен 100 мкл, (2), (16), (18)- белковые полосы.



**Рис. 2.** Гистограммы, демонстрирующие абсолютное содержание белковых полос 2, 16 и 18 в точке экстракции 14 в треках электрофореграммы, представленной на рис. 1 а: трек 1 - контроль (донорская кровь), треки 2-4 - препараты от больных с артериальной недостаточностью, треки 5-7 - препараты от больных с венозной недостаточностью (нумерация треков приведена на оси абсцисс).

### Результаты и обсуждение.

Для выполнения этой работы в нашей лаборатории была изучена воспроизводимость данных экстракции белков мембран эритроцитов у доноров в точке 14 двухкоординатной диаграммы [3]. Серии опытов, проведенных на группах по шесть доноров, показали, что для большинства белков воспроизводимость результатов составляет порядка 15-20%. Для трех белков обнаружены достоверные воспроизводимые отклонения от среднестатистического значения порядка 40%.

Аналогичные параметры у больных (опыты выполнены в сериях на шести больных с артериальной и венозной недостаточностью) изучали в двух точках экстракции (точки 14 и 16) (рис. 1а, б). Точка 14, как было отмечено выше, является чувствительной точкой перехода на двухкоординатной диаграмме NaCl - тритон X-100. Точка же 16 является максимальной экстрагирующей [2]. При сравнении треков доноров и больных (рис. 1 а, б) обнаружено, что ни одна картина спектров белков исследованных больных количественно не повторяет соседнюю, хотя качественно очень схожи.

Представленные на гистограммах результаты (рис. 2) являются конкретными экспериментальными данными, полученными на крови шести

больных (в данном случае вопрос усреднения имеет смысл только в сравнении с данными, полученными на донорах). Следовательно, по различиям в результатах воспроизводимости, полученных в экспериментах с донорами и с больными, можно судить о возможности выявления достоверных отклонений в белковой картине экстракции в определенной точке. На основании этого, условно можно выделить три группы белков (по граничным условиям, выявленным на донорах).

Первая группа – белковые полосы 1, 8, 10, 14 и 18, отклонения количества которых от среднестатистического значения составляют менее 20% (рис. 1а, рис. 2а, белковая полоса 18). У второй группы белков (белковые полосы 2, 4, 5, 6, 9, 11, 12, 13, 15, 17) отклонения количества от среднестатистического значения составляют до 40% (рис. 1а, рис. 2б, белковая полоса 2). В третью группу входят лишь два белка (белковые полосы 16 и 19), у которых отклонения выше 40% (рис. 1а, рис. 2в, белковая полоса 16).

Сравнение результатов опытов на донорах и на больных показало, что у больных обнаруживается больше отклонений, чем у доноров. Наши эксперименты являются предварительными, и на данном этапе мы не можем однозначно заключить, что эти отклонения отражают болезненное состояние. Мы лишь уверены, что по мере накопления данных в этом аспекте станет возможным использование этого подхода в качестве поддающегося количественной оценке тест-анализа для диагностических целей.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Гулак П.В., Орлов С.Н., Шнырев В.Л., Орлов Н.Я., Покудин Н.И., Постнов Ю.В. Кардиология, 12, 59, 1983.
2. Калачян А.В. Автореф. канд. дисс., Ереван, 1991.
3. Мнацаканян Г.А., Абрамян А.Ш., Калачян А.В., Оганисян А.И., Арутюнян А.А. Биолог. журн. Армении, 52, 3-4, 188-191, 1999.
4. Baba A., Yoshikawa T., Nakamura I., Iwata M., Wainai Y., Ogawa S. J. Card. Fail., 4, 4, 333-341, 1998.
5. Bhattacharyya R., Das A.K., Moitra P.K., Pal B., Mandal I., Basu J. Biochem. J., 1, 340, (Pt 2), 505-512, 1999.
6. Boshetti A., Saulton-Heiniger E., Elemetson K.J. In Membrane Proteins a Laboratori Manual, Berlin-Heideberg-New-York, 3-13, 1981.
7. Haest C.W.M. Biochim. Biophys. Acta, 694, 331- 352, 1982.
8. Laemmli U.K. Nature, 227, 680 –685, 1970.
9. Snimoniiia G.V., Tatishvili N.I., Shiliia D.Sh., Bakanidze N.T., Khachidze M.V. Biokhimiia, 57, 9, 1343-1347, 1992.
10. Steck T.L. J. Mol. Biol., 66, 295-305, 1972.
11. Teraoka K., Miyagoshi M., Fujikawa K., Odajima S., Sugita T., Asaji T., Matsui S., Tsuritani I., Honda R., Yamada Y. Rinsho Byori, 40, 4, 410-416, 1992.
12. Yucel D., Aydogdu S., Cehreli S., Saydam G., Canatan H., Senes M., Cigdem Topkaya B., Nebioglu S. Clin. Chem., 44, 1, 148-154, 1998.

Поступила 27.X.1999