

МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ

УДК 577.352.335:616-018.2

**А. М. Седракян, А. И. Оганисян, А. Ш. Абрамян, А. А. Арутюнян,
В. М. Арутюнян, Г. С. Акопян, академик К. Г. Карагезян**

**Исследование мембран эритроцитов больных
семейной средиземноморской лихорадкой с применением
методического подхода двухкоординатной экстракции**

(Представлено 5/X 2001)

В настоящей работе приведены результаты исследования мембран эритроцитов (МЭ) больных семейной средиземноморской лихорадкой (ССЛ; Familial Mediterranean Fever), известной также как периодическая болезнь (ПБ), с применением методического подхода "многокоординатной экстракции белков" из мембранных структур [1-3]. Экстракцию осуществляли в системе экстракции тритон X-100 – NaCl, наиболее информативной для белков МЭ человека [1].

Патологический процесс при ССЛ приводит к развитию общих гомеостатических сдвигов и изменений в различных органах и системах [4]. Популяция эритронов весьма чувствительна к различным патологическим процессам в организме и откликается на них адекватными изменениями. Особый интерес представляют данные о подавлении процессов фосфатидогенеза у больных ССЛ, сопрягаемые с неустойчивым состоянием мембранных структур; выявленные при этом сдвиги в содержании фосфолипидов (ФЛ) МЭ [5-7] обуславливают целесообразность исследования состояния белков МЭ в сложной надмолекулярной системе биомембраны.

МЭ человека получали методом гипотонического гемолиза [8] из 3 мл цитратной крови. Обследованы 2 группы людей: I - доноры; II - больные ССЛ. Конечные осадки отмытых МЭ суспензировали в 10 mM трис-HCl буфере, pH 7.4 ("Serva", США) до концентрации белка 4 мг/мл, которую определяли по методу Брэдфорда [9].

Селективное высвобождение белков из МЭ осуществляли, используя методический подход "двухкоординатной экстракции" [1]. Каждая проба МЭ (доноры, больные ССЛ) разбивалась на 6 аликвот по 100 мкл, которые затем подвергались обработке реагентами тритон X-100 – NaCl в 6 различных комбинациях концентраций, которые приведены на рис. 1 в виде точек сетки экстракции.

NaCl			
0.70	M	-	6
0.35	M	4	5
0.14	M	2	3
0		1	-
		0.05%	0.25%
		Triton X-100	

Рис. 1. Нумерация точек экстракции и соответствующие им значения концентраций реагентов в сетке координат экстракции тритон X-100 - NaCl.

Процедуру экстракции образцов донорской группы и больных проводили одновременно и идентично при температуре 0°C в течение 1 ч при непрерывном перемешивании. Солюбилизованный материал отделяли центрифугированием при $30\,000g$ и 0°C в течение 1 ч, надосадки отбирали для электрофореза.

SDS-электрофорез белков проводили по методу Лаеммли [10] в двухступенчатом ПААГ (3%-ном концентрирующем и 10%-ном разделяющем) с использованием silan A-174 для сшивки геля к стеклу. Сканирование электрофореграмм проводили на приборе Ultrascan XL (LKB) при 633 нм.

Нумерацию наблюдаемых белковых полос (23 полосы) на электрофореграммах проводили в порядке убывания молекулярной массы; идентификацию основных белков МЭ человека проводили согласно классификации Стека-Хеста [11]; выход белка оценивали по величине соответствующего пика на денситограмме.

Достоверность различий между средними величинами у здоровых и больных лиц определялась по t-критерию.

Результаты сравнительного исследования солюбилизации белков из МЭ доноров и больных ССЛ отражены на рис.2 и 3, соответственно, в виде таблиц-диаграмм.

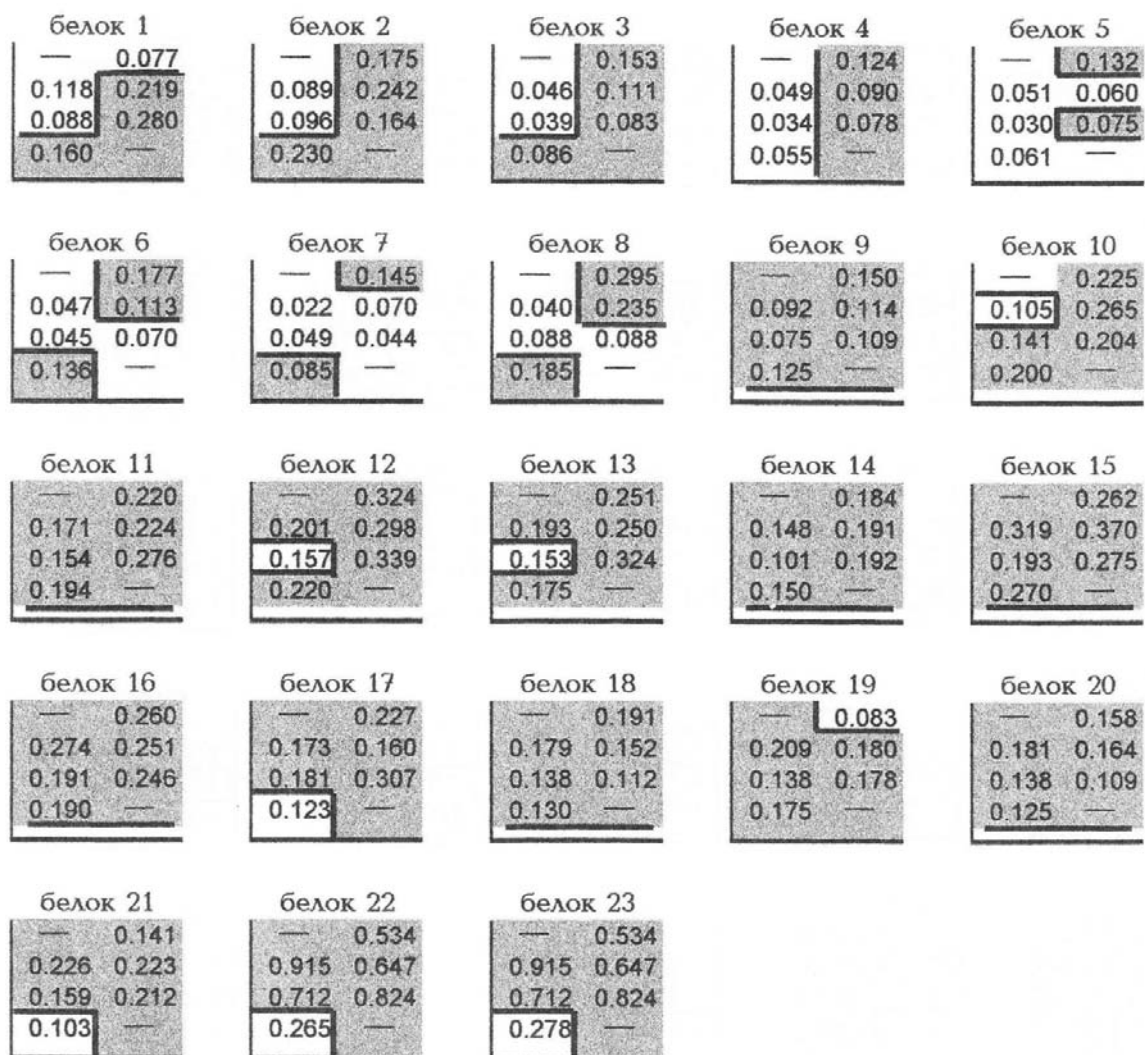


Рис.2. Таблицы — диаграммы выхода белков из МЭ доноров. МЭ обработаны экстрагирующими реагентами в концентрациях согласно сетке экстракции, приведенной на рис.1. Наблюдаемые после электрофоретического разделения надосадков в ПААГ 23 белковые полосы пронумерованы в порядке убывания молекулярных масс,

— линия полувыхода белков, разграничивающая заштрихованную область, в которой выход белка превышает 50% от максимального.

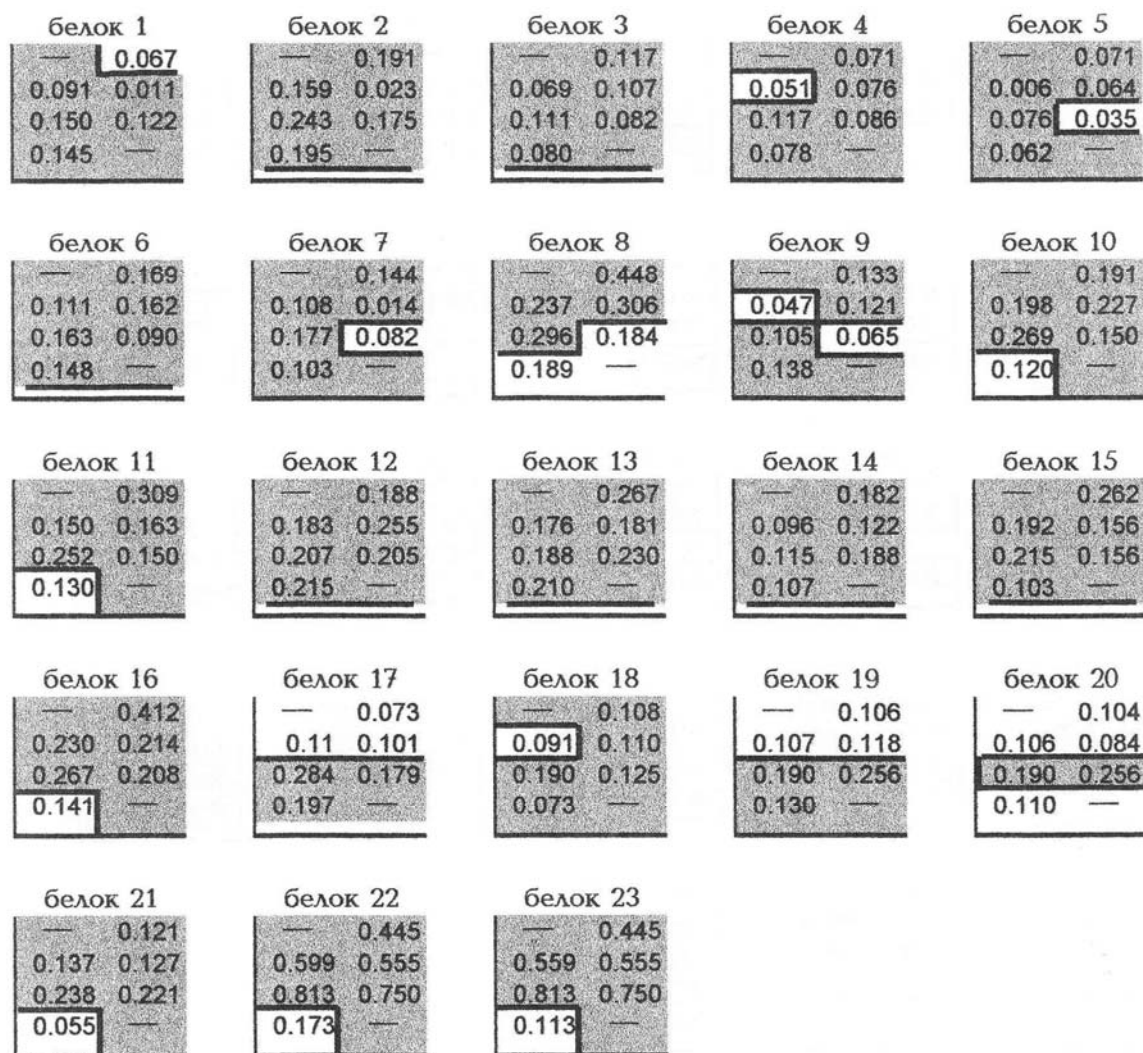


Рис 3 Таблицы – диаграммы выхода белков из МЭ больных ССЛ. МЭ обработаны экстрагирующими реагентами в концентрациях согласно сетке экстракции, приведенной на рис.1. Наблюдаемые после электрофоретического разделения надосадков в ПААГ 23 белковые полосы пронумерованы в порядке убывания молекулярных масс.

— линия полувыхода белков, разграничивающая заштрихованную область, в которой выход белка превышает 50% от максимального.

Таблица-диаграмма для каждой из 23 белковых полос, наблюдаемых на электрофореграммах, представляет собой цифровое поле, соответствующее сетке экстракции на рис.1, в котором на месте каждой точки сетки вписывается полученное значение концентрации белка. На рисунках "линия полувыхода" разграничивает поле точек диаграммы на две области, в одной из которых выход белка превышает 50% от максимального в данной системе экстракции (заштрихованная область). Линия полувыхода характеризует уровень

устойчивости комплекса белок-мембрана и разграничивает условия, при которых белок преимущественно связан с мембраной, от условий, при которых он в основном находится в дезагрегированном состоянии (заштрихованная область). Таким образом, составленные таблицы-диаграммы несут информацию практически о каждом исследуемом белке, характеризуя в зависимости от эффективного экстрагирующего реагента (*NaCl* или тритон X-100) тип взаимодействий, стабилизирующих белок в мембране.

Сравнительный анализ таблиц-диаграмм рис.2 и 3 позволил выявить изменения линий полувыхода для ряда белков при ССЛ. Наблюдаются следующие типы сдвигов в экстрагируемости белков МЭ больных ССЛ:

I – Снижение сродства белков к мембране, наблюдаемое для белков 1-5, 10, 12, 13. Диаграммы белков 1-5 (1, 2 - соответственно α - и β - субъединицы спектрина; 3-5 - анкирин и его минорные фракции), экстрагируемость которых в контрольной группе (рис.2) зависит в основном от тритон X-100, демонстрируют изменение эффективности координаты экстракции *NaCl* при ССЛ (рис. 3). Для белков 1-5 больных ССЛ при низкой концентрации тритона X-100 (0.05%; точки 1, 2, 4 сетки экстракции на рис.1) в основном не наблюдается стабилизирующее действие *NaCl* на белок-мембранный комплекс, четко воспроизводимое в контрольной группе. Следует отметить сохранение у больных специфической характеристики белка 1 (α -спектрин) - в точке экстракции 6 белок удерживается в мембране.

II – Снижение экстрагируемости из мембраны, наблюдаемое для белков 11, 16, 17, 19 и 20. Выход белков 17, 19 (белок цитоскелета актин) и 20 из мембраны в раствор у больных ССЛ зависит исключительно от *NaCl*, который действует на эти белки по-разному. При низкой концентрации *NaCl* (0.14 М; точки 2, 3 на рис.1) белок 17 удерживается в мембране, тогда как стабильное состояние белка 19 в мембране наблюдается при повышенных концентрациях *NaCl* (0.35 М и 0.7 М; точки 4-6 на рис.1). Типы экстракции для белков 17, 19 и 20 больных ССЛ резко отличаются от картины, наблюдаемой в группе доноров, которая характеризуется низким сродством этих белков к мембране. Белок 17 доноров при нулевой концентрации *NaCl* (точка 1, рис. 1) связан с мембраной и экстрагируется при добавлении даже минимальной концентрации *NaCl*. Следует отметить, что характер экстрагируемости из мембраны белка 20 больных только при концентрации *NaCl*, близкой к физиологическому значению (0.14 М; точки 2, 3 на рис.1), аналогичен картине, полученной для донорской группы.

III – Специфические сдвиги в экстрагируемости, индивидуальные для каждого из белков 6-9 (область, соответствующая белку полосы 3 МЭ). Некоторое сходство в конфигурации линий полувыхода белков 6 – 8, наблюдаемое в контрольной группе (рис. 2), не регистрируется в группе больных (рис.3). Следует отметить, что белки 7, 8 и 9 связаны с мембраной в точке экстракции 3 (рис.1), т. е. при высокой концентрации детергента в условиях близкого к физиологическому значению содержания *NaCl*.

Полученные нами данные показывают, что использование методического подхода "двухкоординатной экстракции" в системе координат экстракции тритон X-100 – *NaCl* приводит к получению специфической и полезной информации о динамике изменений, развивающихся в МЭ больных, страдающих ССЛ. Полученные результаты демонстрируют существенные сдвиги экстрагируемости белков из МЭ больных ССЛ, воспроизводимо

наблюдаемые для целого ряда белков, что свидетельствует об изменении их сродства к целостной структуре мембран и дестабилизации МЭ при ССЛ.

Институт молекулярной биологии НАН Армении

Ереванский государственный медицинский университет им. М. Гераци

**Ա. Մ. Մեղրակյան, Ա. Ի. Հովհաննիսյան, Ա. Շ. Աբրահամյան, Ա. Հ. Հարությունյան,
Վ. Ս. Հարությունյան, Գ. Ս. Հակոբյան, ակադեմիկոս Կ. Գ. Ղարազյոզյան**

**Ընտանեկան միջերկրածովյան տենդով տառապող հիվանդների էրիթրոցիտների
թաղանթների հետազոտությունը երկկոորդինատային
լուծագատման մեթոդական մոտեցման կիրառմամբ**

Երկկոորդինատային լուծագատման մեթոդական մոտեցման [1] կիրառմամբ ուսումնասիրվել են ընտանեկան միջերկրածովյան տենդով (ԸՄՏ) տառապող հիվանդների էրիթրոցիտների թաղանթները (ԷԹ): Սպիտակուցների լուծագատումը իրականացվել է մարդու ԷԹ համար առավել արդյունավետ լուծագատման triton X-100 - *NaCl* երկկոորդինատային համակարգի կիրառմամբ: Հայտնաբերված են լուծագատման փոփոխություններ մի շարք ԷԹ սպիտակուցների համար: Ստացված արդյունքները վկայում են ԸՄՏ-ի դեպքում ԷԹ կառուցվածքի ապակայունացման մասին:

Литература

1. Мнацаканян Г. А., Калачян А. С., Шагинян К. А., Акопян Т. Н., Арутюнян А. А. - Биол. журн. Армении. 1989. Т.42. № 6. С. 538-546.
2. Мнацаканян Г. А., Калачян А. С., Шагинян К. А., Акопян Т. Н., Арутюнян А. - Биол. журн. Армении. 1990. Т.43. №12. С. 984-991.
3. Мнацаканян Г. А., Абрамян А. Ш., Калачян А. С., Оганисян А. И., Арутюнян А. А. - Биол. журн. Армении. 1999. Т.52. № 3-4. С.188-191.
4. Арутюнян В. М., Акопян Г. С. Периодическая болезнь (этиогхато-генетические и клинические аспекты). М. Медицинское информационное агентство. 2000. 304 с.
5. Karaguesyan K. G., Haroutjunian V. M., Hakobian G. S. - J. Clin. Pathol. 1996. V. 49. № 6. P.453-455.
6. Торосян Е. Х. ПБ в Армении: тип наследования, концепция этиопатогенеза, классификация и моделирование клинического течения у детей. Автореф. докт. дис. Ереван, 1996. 48 с.
7. Garsia Gonsales A. Weisman M. H. - Semin Arthritis Rheum. 1992. V.22. № 3. P. 139-150.
8. Гулак П. В., Орлов С. Н., Шныров В. Л., Орлов Н. Я., Литвинов И. С., Покудин Н. И., Постнов Ю. В. - Кардиология. 1983. Т. 12. С.59.
9. Bradford M. M. - Anal. Biochem. 1976. V.72. P.248-254.
10. Laemmli U. K. - Nature. 1970. V.227. P.680-685.

11. *Haest C. W.* - Biochem. Biophys. Acta. 1982. V.694. P.331-352.