

мозило рабочий процесс в регистратуре, т. к. врачам приходилось связываться с регистратурой и уточнять соответствие паспортных данных пациента в направлениях на анализы и в документации лаборатории.

Введение в эксплуатацию информационной системы позволило уменьшить время обслуживания посетителей в регистратуре на 60–70%, что привело к улучшению психологического климата в учреждении, оптимизации работы регистратуры медицинского центра и уменьшению степени эмоционального выгорания ее сотрудников. Этому также способствовало проведение статистического учета в автоматическом режиме, что не только предотвратило возникновение технических ошибок в статистической документации учреждения, но и дало возможность рационализировать трудовой процесс медицинских регистраторов.

Литература/References

1. Григорьев, В.А. Проектирование компьютерных сетей: учебное пособие / В.А. Григорьев, В.В. Лебедев, А.Р. Хабаров. – Тверь: ТвГТУ, 2013. – 172 с.
2. Григорьев, В.А. Исследование защищенных автоматизированных систем обработки информации / В.А. Григорьев, В.В. Лебедев // Информационные ресурсы и системы в экономике, науке и образовании: сб. науч. ст. Международной научно-практической конференции. – Пенза, 2011. – С. 65–67.

Grigor'ev, V.A. Issledovanie zashhishhjonnyh avtomatizirovannyh sistem obrabotki informacii / V.A. Grigor'ev, V.V. Lebedev // Informacionnye resursy i sistemy v jekonomie, nauke i obrazovanii: sb. nauch. st. Mezhdunarodnoj nauchno-prakticheskoj konferencii. – Penza, 2011. – S. 65–67.

3. Григорьев, В.А. Информационная система мониторинга и контроля технически сложного объекта / В.А. Григорьев, В.В. Лебедев // Информационные ресурсы и системы в экономике, науке и образовании: сб. науч. ст. Международной научно-практической конференции. – Пенза, 2011. – С. 63–65.

Grigor'ev, V.A. Informacionnaja sistema monitoringa i kontrolja tehnički slozhnogo ob#ekta/ V.A. Grigor'ev, V.V. Lebedev // Informacionnye resursy i sistemy v jekonomie, nauke i obrazovanii: sb. nauch. st. Mezhdunarodnoj nauchno-prakticheskoj konferencii. – Penza, 2011. – S. 63–65.

4. Григорьев, В.А. Системы телекоммуникационных сетей для реализации бизнес-процессов: учебное пособие / В.А. Григорьев, В.В. Лебедев, О.Л. Чернышев. – Тверь: ТвГТУ, 2016. – 122 с.

Grigor'ev, V.A. Sistemy telekommunikacionnyh setej dlja realizacii biznes-processov: uchebnoe posobie / V.A. Grigor'ev, V.V. Lebedev, O.L. Chernyshev. – Tver': TvGTU, 2016. – 122 s.

Неведомский Александр Николаевич (контактное лицо) – старший преподаватель кафедры электронных вычислительных машин ФГБОУ ВО «Тверской государственный технический университет». Тверь, просп. Ленина, д. 25. Тел. 8 (4822) 78-93-24; e-mail: altair@mail.ru.

УДК 577.15.08+577.152.231

Г.А. Грибанов¹, М.В. Миняев²

МЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ ТРАНСАЦИЛАЗНОЙ АКТИВНОСТИ В ТКАНЕВЫХ ПРЕПАРАТАХ

¹ФГБОУ ВО «Тверской государственный университет»
²ФГБОУ ВО Тверской государственный медицинский университет Минздрова России

Разработан высокочувствительный метод определения активности ферментов липидного метаболизма в сложных системах (кровь, гомогенаты, тканевые препараты и др.) с инкубацией реакционной смеси непосредственно на хроматографических пластинках. С его помощью в белом веществе головного мозга крыс выявлена лецитинхолестерол-ацилтрансферазная активность, составившая 250 ± 29 мкг/мг×ч по приросту продукта.

Ключевые слова: трансацилаза; лецитинхолестерол-ацилтрансфераза; микротонкослойная хроматография; инкубация; активность фермента.

METHOD OF DETERMINATION TRANSACYLASTIC ACTIVITY IN TISSUES

G.A. Gribanov¹, M.V. Miniaev²

¹Tver State University
²Tver State Medical University

A highly sensitive method for determining the activity of lipid metabolism enzymes in complex systems (blood, homogenates, tissue preparations, etc.) was developed with the incubation of the reaction mixture directly on chromatographic plates. With its help lecithincholesterol-acyltransferase activity was detected in the white matter of the brain of rats, which was 250 ± 29 µg/mg×h according to the increase in the product.

Key words: acyltransferase; lecithincholesterol-acyltransferase; microthin-layer chromatography; incubation; enzyme activity.

Введение

Изучение ферментативной активности в сложных биологических системах (кровь, гомогенаты, тканевые препараты) зачастую сопровождается хроматографическим выделением продукта (субстрата) реакции из реакционной смеси перед его количественным определением, в связи с чем используются методы, предполагающие инкубирование смеси непосредственно на хроматографических пластинках [1–4]. Данный подход, позволяющий существенно уменьшить объем пробы, исключить ряд трудоемких процедур и сократить затраты, хорошо зарекомендовал себя для определения протеолитической [5] и амилолитической [2] активности. Однако при изучении ферментов липидного метаболизма его использование затруднено необходимостью создания в малом объеме пробы развитой поверхности раздела фаз липид-вода [1, 3, 6], от площади и стабильности которой напрямую зависит точность и воспроизводимость результатов. В этом отношении весьма перспективным представляется метод формирования тонкого слоя липидов на развитой поверхности твердого носителя заданной степени дисперсности, например, силикагеля [7], позволяющий в малом объеме создать достаточно большие, но в то же время хорошо воспроизводимые в серии поверхности раздела. Поэтому нами [8] было предложено наносить раствор липида в хлороформе непосредственно на силикагель хроматографической пластинки, где после выпаривания растворителя возникает тонкий слой липидов на поверхности частиц силикагеля, а последующее нанесение водной фазы (ферментного препарата) ведет к формированию развитой и стабильной поверхности раздела фаз.

Метод был успешно опробован на односубстратной системе для определения холестеролэстеразной активности [8], закономерно возник вопрос о его применимости для изучения ферментативных реакций с участием более одного субстрата липидной природы, так как низкая латеральная подвижность липидных молекул, сорбированных на поверхности твердых частиц, могла оказаться существенным препятствием для протекания подобного рода реакций.

Целью работы стала проверка пригодности метода для определения активности лецитинхолестерол-ацилтрансферазы (2.3.1.43), катализирующей взаимодействие между двумя липидными молекулами и присутствующей в нервной ткани [9].

Материалы и методы

Для инкубации реакционной смеси непосредственно на хроматографических пластинках использовалась камера (рисунок 1), изготовленная из листового полиметилметакрилата толщиной 5 мм [8], которая состоит из корпуса (1) и крышки (2), на которой при помощи зажима (7) закрепляется хроматографическая пластинка (3) слоем силикагеля вниз. Камера перегородкой делится на два отсека: сухой (4) и влажный (5). Влажный отсек перед началом работы заполняется водой таким образом, чтобы

зазор между ее поверхностью и слоем силикагеля не превышал 2 мм. Заполненная водой камера без хроматографической пластинки устанавливалась в суховоздушный термостат, предварительно прогретый до 37 °С за 30 мин до начала эксперимента.

В работе использовались покрытые силикагелем (L 5/40 μ) стеклянные хроматографические пластинки (50×75 мм), которые размечали на 3 продольные дорожки. Пластинку закрепляли в крышке камеры для инкубации (рис. 2), после чего приступали к нанесению реагентов в стартовые точки дорожек хроматографической пластинки (6). Вначале наносили ферментный препарат (гомогенат) на дорожку 1, затем раствор смеси субстратов на дорожки 2 и 3. Пластинку оставляли на воздухе до высыхания гомогената (10 мин). Только после этого наносили гомогенат и буферный раствор (трис-HCl; pH 7,2) на дорожку 3. Сразу после нанесения реагентов крышку вместе с хроматографической пластинкой переворачивали и устанавливали на 2 часа в камеру для инкубации (рис. 1), размещенную в суховоздушном термостате.

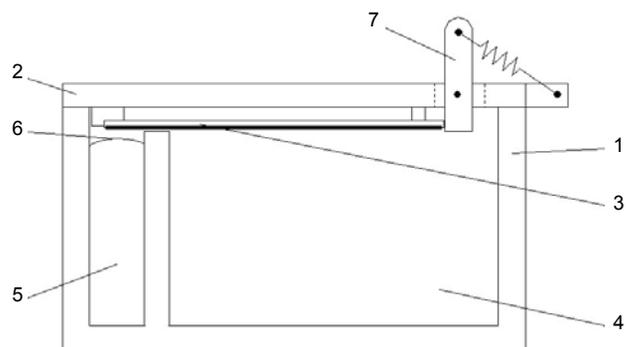


Рис. 1. Камера для инкубации (вид сбоку):

- 1 – корпус; 2 – крышка; 3 – хроматографическая пластинка;
- 4 – сухой отсек; 5 – влажный отсек; 6 – уровень воды, 7 – зажим

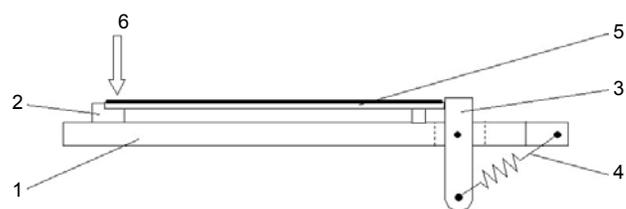


Рис. 2. Положение крышки при нанесении реагентов (вид сбоку):

- 1 – крышка; 2 – упор; 3 – зажим; 4 – пружина;
- 5 – хроматографическая пластинка; 6 – место нанесения реагентов

По истечении срока инкубации пластинку извлекали, высушивали на воздухе и проводили хроматографическое разделение [10] субстратов и продукта реакции в системе гексан – диэтиловый эфир – метанол – ледяная уксусная кислота (9:2:0,2:0,3 по объему). Фракции проявляли в парах йода и идентифицировали по величине R_f. Участки силикагеля, соответствующие фракциям участников реакции, размечали и после выпаривания йода счищали с пластинки, после чего липиды экстрагировали смесью хлороформа с метанолом (2:1).

Количественное определение липидов [10] проводили методом фотометрии (400 нм) продуктов их сжигания с концентрированной серной кислотой (180–200°C). Для получения контрольных значений суммировали количество липидов в соответствующих фракциях на дорожках 1 и 2, что позволило учесть как количество субстратов, нанесенных на пластинку из раствора в хлороформе, так и их исходное содержание в гомогенате.

Субстраты – холестерин (Х) и смесь фосфолипидов (ФЛ), полученные методом микротонкослойной хроматографии [10] из печени крыс, растворяли в хлороформе из расчета приблизительно 500 мкг/мл для Х и 1000 мкг/мл для ФЛ. В качестве ферментных препаратов использовались гомогенаты серого и белого вещества головного мозга беспородных крыс-самцов, которые готовили на холоде в стеклянном гомогенизаторе из 80 мг соответствующей ткани и 2 мл предварительно охлажденного физиологического раствора. Определение содержания белка в гомогенате производилось методом Лоури [11].

Результаты и обсуждение

Усредненные результаты количественного определения субстратов и продуктов лецитинхолестеролацилтрансферазной реакции после инкубации с гомогенатом белого вещества головного мозга крыс представлены на рис. 3.

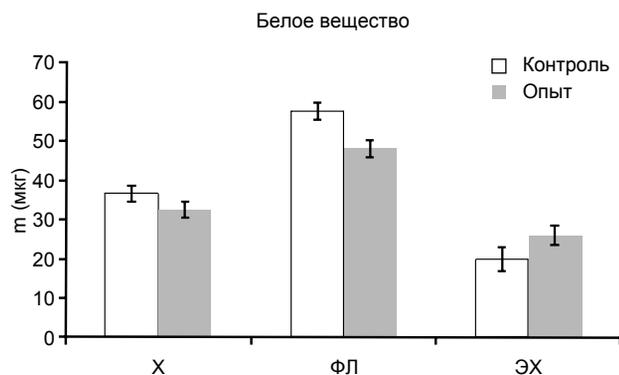


Рис. 3. Изменение содержания продукта и субстратов лецитинхолестеролацилтрансферазной реакции после 2 часов инкубации с гомогенатом белого вещества головного мозга крыс

Как видно из рисунка, двухчасовая инкубация реакционной смеси непосредственно на хроматографической пластинке привела к заметному приросту содержания эфиров холестерина (ЭХ) на фоне убыли свободного холестерина и фосфолипидов, что свидетельствует о наличии лецитинхолестеролацилтрансферазной активности в ткани белого вещества мозга. Активность оказалась сравнительно невысока, поэтому, чтобы убедиться, что полученный результат не является артефактом, связанным с особенностями предлагаемого метода, тот же эксперимент в тех же условиях был проведен с гомогенатом серого вещества головного мозга крыс (рис. 4).

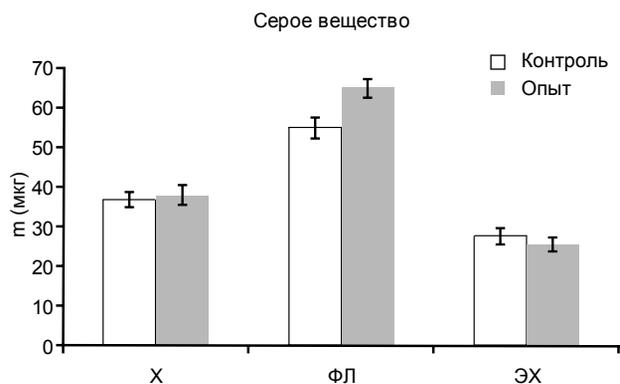


Рис. 4. Изменение содержания продукта и субстратов лецитинхолестеролацилтрансферазной реакции после 2 часов инкубации с гомогенатом серого вещества головного мозга крыс.

Как видно из рисунка, в сером веществе обнаружилось снижение содержания эфиров холестерина, сопровождавшееся ростом количества свободного холестерина и фосфолипидов. А так как оба эксперимента проводились при значительном избытке одного из субстратов (ФЛ), полученный результат нельзя объяснять обращением лецитинхолестеролацилтрансферазной реакции. Вероятнее всего, наблюдаемые изменения были обусловлены преобладанием в ткани серого вещества мозга холестеролацилтрансферазной (3.1.1.13) активности [3, 12, 13].

Как видно из рисунков 3 и 4, несмотря на закономерные и согласованные изменения содержания веществ – участников реакции, прирост и убыль эфиров холестерина отличались довольно низкой достоверностью. Это объясняется неизбежным разбросом исходного содержания субстратов на пластинке по причине испарения хлороформа из их растворов. Поэтому более корректной оказалась статистическая обработка не абсолютного содержания продукта в опыте и контроле, а значений его прироста или убыли (табл. 1).

Таблица 1

Изменение содержания эфиров холестерина (мкг) после 2 часов инкубации реакционной смеси на хроматографической пластинке

№	Серое вещество			Белое вещество		
	Конт-роль	Опыт	Раз-ность	Конт-роль	Опыт	Раз-ность
1	26	26	0	17	24	7
2	26	23	-3	25	30	5
3	31	28	-3	18	24	6
\bar{X}	28	26	-2	20	26	6
$\pm m$	2,0	1,8	1,2	3,1	2,4	0,7

Таким образом, значимым оказался не только прирост эфиров холестерина в гомогенате белого вещества, но и убыль в гомогенате серого, что позволило корректно определить значения ферментативной активности для обеих тканей: лецитинхолестеролацилтрансферазная активность в гомогенате белого вещества составила 250 ± 29 мкг/мг×ч, а предположительно холестеролацилтрансферазная в гомогенате серого – 71 ± 44 мкг/мг×ч.

Выводы

1. Разработан высокочувствительный метод определения активности ферментов липидного метаболизма с инкубацией реакционной смеси непосредственно на хроматографических пластинках.

2. Метод пригоден для определения активности ферментов, катализирующих взаимодействие двух субстратов липидной природы.

3. В белом веществе головного мозга крыс выявлена лецитинхолестерол-ацилтрансферазная активность, составляющая 250 ± 29 мкг/мг×ч.

4. В сером веществе выявлена гидролазная (предположительно холестеролэстеразная) активность, составляющая 71 ± 44 мкг/мг×ч.

Благодарности

Автор выражает глубокую благодарность Колдунову Валентину Владиславовичу за большой вклад в дело получения экспериментальных данных, легших в основу данной публикации.

Литература/References

1. Dutta, J. Enzymatic reactions on thin-layer chromatographic plates. I. Lipolysis of triglycerides and separation of products on a single plate / J. Dutta, K. Das Arun, S. Saha // Journal of Chromatography. – 1978. – Vol. 154, № 1. – P. 39–50.

2. Lombard, A. An situ reactions on silica gel thin-layers in studies on plant digoscharides / A. Lombard, M.L. Joum, M. Buffa // Journal of Chromatography. – 1977. – Vol. 134, № 1. – P. 242–245.

3. Mandal, S.B. Assay of phospholipase D on a thin-layer chromatographic plate / S.B. Mandal, S.K. Biswas, P. Chakrabarti // Journal of Chromatography. – 1980. – Vol. 188, № 1. – P. 292–296.

4. Zoch, E. Dunnschicht chromatographische Direktmethode zum Nachweis von Ezymwirkungen / E. Zoch // Journal of Chromatography. – 1970. – Vol. 48, № 36. – P. 558–559.

5. Lentze, M. A simple thin-layer chromatographic technique for the assay of intestinal dipeptide hydrolases from human mucosal biopsy material / M. Lentze, J. Schaub, H. Hartis // Clinica Chimica Acta. – 1973. – V. 49, № 1. – P. 19–26.

6. Брокерхоф, Х. Липолитические ферменты / Х. Брокерхоф, Р. Дженсен. – М.: Мир, 1978. – 396 с.

Brokerhof, X. Lipolitesche fermente / H. Brokerhof, R. Dzhensen. – М.: Мир, 1978. – 396 с.

7. Митрофанова, А.Н. Об устойчивости монослоев лецитина на силикагеле / А.Н. Митрофанова, О.М. Полторак // Вестник Московского университета. Химия. – 1973. – Т. 14, № 3. – С. 278–281.

Mitrofanova, A.N. Ob ustojchivosti monosloev lecitina na silikagele / A.N. Mitrofanova, O.M. Poltorak // Vestnik Moskovskogo universiteta. Himija. – 1973. – T. 14, № 3. – S. 278–281.

8. Грибанов, Г.А. Определение холестеролэстеразной активности с применением микротонкослойной хроматографии / Г.А. Грибанов, М.В. Миняев // Вопросы медицинской химии. – 1992. – Т. 38, № 2. – С. 59–61.

Gribanov, G.A. Opredelenie holesteroljesteraznoj aktivnosti s primeneniem mikrotonkoslojnoj hromatografii / G.A. Gribanov, M.V. Minjaev // Voprosy medicinskoj himii. – 1992. – T. 38, № 2. – S. 59–61.

9. Collet, X., Francone O., Besnard F., Fielding C.J. Secretion of lecithincholesterol acyltransferase by brain neuroglial cell lines / X. Collet, O. Francone, F. Besnard, C.J. Fielding // Biochemical and Biophysical Research Communications. – 1999. – Vol. 258, № 1. – P. 73–76.

10. Грибанов, Г.А. Экспресс-анализ общих липидов и их фракций сыворотки крови / Г.А. Грибанов, С.А. Сергеев // Вопросы медицинской химии. – 1975. – № 6. – С. 652–654.

Gribanov, G.A. Jekspress-analiz obshhix lipidov i ih frakcij syvorotki krovi / G.A. Gribanov, S.A. Sergeev // Voprosy medicinskoj himii. – 1975. – № 6. – S. 652–654.

11. Lowry, O.H. Protein measurement with the Folin phenol reagent / O.H. Lowry, N.J. Rosebrough, A.L. Farr, R.J. Randall // The Journal of Biological Chemistry. – 1951. – Vol. 193, № 1. – P. 265–275.

12. Ghosh, S., Grogan W.M. Decline in cholesteryl ester hydrolase activity of rat brain with progress of experimental allergic encephalomyelitis followed by rebound during recovery / S. Ghosh, W.M. Grogan // Brain Research. – 1991. – Vol. 547, № 2. – P. 327–330.

13. Morinaga, N. Synthesis of fatty acid sterol esters using cholesterol esterase from Trichoderma sp. AS59 / N. Morinaga [et al.] // Enzyme and Microbial Technology. – 2011. – Vol. 48, № 6–7. – P. 498–504.

Миняев Михаил Владимирович (контактное лицо) – к. б. н., специалист отдела планирования и организации НИР ФГБОУ ВО Тверской государственной медицинской университет Минздрава России. 170100, Тверь, ул. Советская, д. 4. Тел. 8 (4822) 34-37-85; e-mail: mmb_77@mail.ru.