

альбумина фукоза появляется уже на начальных стадиях развития опухоли, т. е. значительно раньше, чем в сыворотке крови. Полученные данные недостаточны для обсуждения вопроса о роли фукозы в организме при опухолевом росте, однако позволяют высказать предположение, что фукозилирование альбумина, по-видимому, является защитной реакцией организма, ведущей к удалению избыточного количества фукозы, «сбрасываемой» с поверхности подвергшихся злокачественной трансформации клеток в сыворотку крови.

Определение содержания фукозы в сыворотке крови, а также в составе сывороточного альбумина наряду с другими методами исследования может быть использовано в процессе отбора лиц с повышенным онкологическим риском, как дифференциально-диагностический тест в ранней диагностике рака желудка и для определения распространенности опухолевого процесса в дооперационном периоде.

Авторы считают своим долгом выразить благодарность член-корр. АН УССР Г. В. Троицкому за постановку задачи исследования и помощь при обсуждении его результатов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Бассалык Л. С., Новиков А. М., Соколова В. Д., Сорокин Е. Н. // *Вопр. мед. химии.* — 1984. — № 3. — С. 124.
2. Кочетов Г. А. Практическое руководство по энзимологии. — М., 1971. — С. 309—311.
3. Троицкий Г. В., Багдасарьян С. Н. // *Бюл. Экспер. биол.* — 1981. — № 11. — С. 586.
4. Троицкий Г. В. // *Электрофорез белков.* — Харьков, 1962. — С. 262—270.
5. Nordquist R. E., Anglin I. N., Lerner M. O. // *Brit. J. Cancer.* — 1978. — Vol. 37. — P. 776.
6. Miyauchi T., Yonezawa S., Takamura T. et al. // *Nature.* — 1982. — Vol. 299. — P. 168.
7. Richards C. S., Medina D., Butel J. S., Steiner M. R. // *Cancer Res.* — 1981. — Vol. 41. — P. 4967.

Поступила 06.02.86

FUCOSYLATION OF BLOOD SERUM PROTEINS IN STOMACH CANCER

V. M. Sorkin, S. N. Borisenko, G. A. Kasymova
Crimean Medical School, Simpheropol

Content of fucose and of fucosylated protein fractions was studied in blood serum of healthy donors as well as in blood serum of patients with chronic gastritis and with stomach cancer. Concentration of fucose was increased in blood serum under conditions of the tumor generalization. At the same time, content of fucosylated albumin was elevated within early steps of stomach cancer, while the content of fucosylated globulins was decreased. Estimation of albumin-bound fucose might be used in diagnosis of stomach cancer.

УДК 616.379-008.64-092.9-06:616.153.455-008.64-07:616.153.96-074

Н. В. Пушкина, И. Е. Цыбульский, А. И. Лукаш

АМИДИРОВАННОСТЬ БЕЛКОВ КРОВИ В УСЛОВИЯХ ГИПЕРГЛИКЕМИИ ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ САХАРНОМ ДИАБЕТЕ

Кафедра биохимии и биотехнологии Ростовского университета им. М. А. Суслова

При сахарном диабете обнаружены многосторонние нарушения метаболизма, в том числе белкового [14, 19]. Патогенез сахарного диабета имеет определенное сходство с нарушениями метаболизма при старении. Для них характерны некоторые общие признаки: нарушение обеспеченности инсулином (часто из-за снижения его биологической активности), повышение уровня аутоантител, патологические изменения биоструктур на молекулярном уровне. Замедленная утилизация глюкозы при диабете и часто наблюдаемое в старости снижение толерантности к глюкозе вызывают повышенное в течение длительного времени

содержание глюкозы в крови, что определяет такие постсинтетические модификации белков, как неферментативное гликозилирование и ковалентное сшивание гликозилированных белковых молекул [18].

Другим процессом модификации белков при старении является пепферментативное дезамидирование аминокислотных остатков аспарагина и глутамина [6], изменяющее физико-химические свойства и функциональную активность белковых молекул [3]. В экспериментах *in vitro* показана взаимосвязь между процессами неферментативного гликозилирования и дезамидирования [8]. Это дало основание пред-

положить наличие такой взаимосвязи при гипергликемии, вызванной сахарным диабетом.

Задачей настоящего исследования явилось изучение амидированности альбумина и гемоглобина в условиях гипергликемии аллоксанового диабета.

Методика

Свежеприготовленный раствор аллоксана вводили подкожно в дозе 200 мг на 1 кг массы белым крысам, не получавшим пищи в течение 24 ч. На 15-е сутки после введения определяли уровень глюкозы в крови О-толуидиновым методом и в случае нормального содержания глюкозы инъекции повторяли. Контролем служили животные, инъецированные физиологическим раствором.

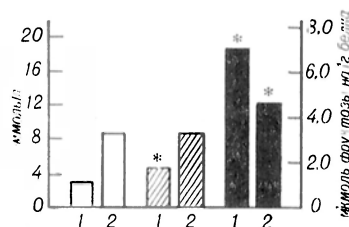
Для контроля за глубиной развившегося заболевания определяли содержание гликозилированного гемоглобина (Hb A₁) усовершенствованным колориметрическим методом [17]. К 1 мл гемолизата отмытых в физиологическом растворе эритроцитов, содержащего 10 мг гемоглобина (или стандарта фруктозы), добавляли 1 мл 0,5 М раствора щавелевой кислоты и инкубировали в автоклаве 60 мин при 124 °С. Белок осаждали ТХУ. В надосадочной жидкости определяли количество 5-оксиметилфурфурола (образуется из остатков глюкозы гликозилированного белка в кислой среде при 124 °С) характерной реакцией с тиобарбитуровой кислотой. Результаты выражали в микромолях фруктозы на 1 г белка.

Альбумин из осажденных ТХУ белков сыворотки крови экстрагировали этанолом [20]. Диск-электрофорезом в полиакриламидном геле [4] показана достаточная чистота полученных препаратов альбумина, содержавших 82 % альбумина мономерной формы и незначительное количество его димеров.

Из спиртовых экстрактов сывороточного альбумина и гемолизатов эритроцитов, которые содержат 98 % гемоглобина, белки осаждали добавлением ТХУ, очищали органическими растворителями и использовали для определения суммарной амидированности (САГ), а также фракций легкогидролизуемых (ЛАГ) и трудногидролизуемых (ТАГ) амидных групп [7].

Результаты и обсуждение

Модель сахарного диабета, полученная в нашем эксперименте, позволила исследовать амидированность и гликозилирование белков крови в условиях продолжительной инсулиновой недостаточности и гипергликемии. После инъекций аллоксана были отобраны крысы с четкими признаками диабета (экспериментальная группа животных). Уровень глюкозы в крови этих животных поднялся до 14,7–25,0 ммоль/л против 3,6 ммоль/л в контрольной группе и в среднем превысил контрольный уровень в 5 раз (см. ри-



Содержание глюкозы (1) и гликозилированного гемоглобина (2) при введении аллоксана крысам.

Светлые столбики — контрольные животные; заштрихованные — резистентные к аллоксану; темные — животные с развившимся диабетом; звездочкой отмечены изменения, статистически достоверные по отношению к группе контрольных животных ($p < 0.001$). По осям ординат: слева — содержание глюкозы в крови, ммоль/л; справа — содержание HbA₁, ммоль фруктозы на 1 г белка.

сунок). Животных с неразвившимся сахарным диабетом (резистентных к аллоксану) использовали для доказательства отсутствия непосредственного влияния аллоксана на исследуемые показатели амидированности.

Количество Hb A₁ в крови резистентных к аллоксану крыс практически не отличалось от содержания гликозилированного гемоглобина в контрольной группе ($p > 0.1$). Напротив, уровень гликозилирования гемоглобина у животных с высоким содержанием глюкозы на 41,7 % превысил концентрацию Hb A₁ в крови контрольных и резистентных к аллоксану крыс. Следовательно, повышенное содержание гликозилированного гемоглобина свидетельствует о стабильно высоком уровне глюкозы в крови животных экспериментальной группы в течение продолжительного времени, что является надежным показателем развившегося диабета.

Общая амидированность, а также содержание фракций ЛАГ и ТАГ в альбумине заболевших диабетом и резистентных к аллоксану крыс статистически достоверно не отличаются от амидированности альбумина контрольных животных (см. таблицу) и соответствуют данным литературы по содержанию амидов в молекуле альбумина [13].

Степень и характер амидированности гемоглобина животных с неразвившимся диабетом также не отличаются от показателей амидированности гемоглобина в контроле (см. таблицу). Однако содержание САГ, ЛАГ и ТАГ в гемоглобине заболевших диабетом крыс оказалось соответственно

Амидированность альбумина и гемоглобина при введении аллоксана крысам (в мкмольях амидного азота на 1 г белка)

Содержание амидов в белках		Группа животных		
		контрольные (n = 12)	резистентные (n = 7)	с диабетом (n = 5)
Альбумин	САГ	582 ± 8,30	578 ± 12,70	574 ± 12,71
	ЛАГ	232 ± 3,47	236 ± 5,24	234 ± 3,84
	ТАГ	349 ± 9,22	341 ± 12,46	341 ± 15,04
Гемоглобин	САГ	460 ± 5,01	460 ± 8,51	399 ± 4,03*
	ЛАГ	173 ± 2,96	165 ± 4,03	142 ± 3,11*
	ТАГ	287 ± 5,64	296 ± 11,42	257 ± 4,93*

Примечание. В скобках — число животных. Звездочкой отмечено $p < 0,01$ по отношению к контролю.

на 13,1, 17,6 и 10,4 % ниже, чем в гемоглобине животных контрольной группы.

Расчет количества молей амидов на 1 моль белка показал, что из 29,9 моля амидных групп молекула гемоглобина теряет вследствие развития диабета приблизительно 4 моля, из них 2 моля — легкогидролизуемых. Следовательно, вклад обеих фракций амидных групп в процесс изменения амидированности гемоглобина приблизительно одинаков, но относительное снижение количества ЛАГ в 1,7 раза превосходит уменьшение ТАГ вследствие их различных уровней в контроле.

Деамидирование амидов гемоглобина не может быть следствием общей интоксикации организма при отравлении аллоксаном. Об этом свидетельствует одинаковый уровень амидированности этих белков в группе контрольных и резистентных к аллоксану животных. По-видимому, существенно повышенный уровень глюкозы в крови больных диабетом животных является основной причиной ускоренного деамидирования гемоглобина.

Вероятно, неоднозначность изменений амидированности белков возникает по причине существенных различий во времени жизни альбумина и гемоглобина. Время полужизни альбумина составляет 19 сут [15], продолжительность функционирования гемоглобина сравнима со временем жизни самой эритроцитарной клетки [5]. До выделения белков состояние диабета у животных в эксперименте поддерживалось в течение 1,5—2 мес. Этого времени достаточно для существенного обновления альбумина и только около $1/2$ молекул гемоглобина. Процесс неферментативного деамидирования в

физиологических условиях протекает сравнительно медленно (при деамидировании γ -глобулина период «полужизни» аспарагина равен 36 дням, глутамина — 65 дням [2]). Следовательно, более продолжительное время жизни гемоглобина в условиях гипергликемии нашего эксперимента способствует его неферментативному деамидированию.

Не исключена возможность аналогичного ускорения деамидирования и амидов альбумина. Однако при этом неизбежно повышается чувствительность деамидированного альбумина к сывороточным протеиназам и скорость его выведения из кровяного русла [1]. Можно также предположить включение иммунологической системы в ускорение деамидированного альбумина, который, вероятно, может инициировать синтез аутоантител. Эритроцитарный гемоглобин, напротив, недоступен действию сывороточных протеиназ и антител, его разрушение происходит совместно с эритроцитами после завершения их жизненного цикла [5].

Нарушения метаболизма и биоструктур при диабете, аналогичные наблюдаемым при старении, рассматриваются как признаки ускоренного старения больных диабетом [19]. Биологический возраст больных сахарным диабетом выше, чем их здоровых ровесников, а продолжительность жизни — на несколько лет меньше. В основе многих характерных для диабета нарушений, по мнению некоторых авторов [11, 18], лежит ускоренное старение коллагена, связанное с его гликозилизацией и накоплением поперечных ковалентных сшивок. В связи с этим особый интерес представляют эксперименты, продемонстрировав-

шие ускоренное «старение» коллагена и РНКазы *in vitro* в присутствии глюкозы [10, 14].

Реакция неферментативного дезамидирования амидов в белках также тесно связана с процессами старения на уровне отдельных белков, клеток, тканей и всего организма в целом [6]. Следовательно, дезамидирование остатков аспарагина и глутамина в гемоглобине в условиях гипергликемии можно рассматривать как признак ускоренного «старения» этого белка при диабете.

Другой вопрос, вытекающий из результатов нашего исследования, связан с функциональной характеристикой дезамидированного гемоглобина. Гликозилирование гемоглобина влияет на его сродство к кислороду [16]. Не менее важна роль амидированности в поддержании функциональной активности и свойств многих белков, включая гемоглобин [9]. Вероятно, обнаруженное при диабете дезамидирование аминокислотных остатков амидов в гемоглобине может наряду с гликозилированием изменить сродство гемоглобина к кислороду, что отразится на функции эритроцитов. Подтверждением нашему предположению является показанное *in vivo* дезамидирование остатков аспарагина и глутамина β -цепи Hb A_{1b} [12].

По-видимому, при диабете происходит ускоренное дезамидирование остатков амидов не только в гемоглобине, но и в других, главным образом медленно обновляемых белках, что может отразиться на их свойствах. Таким образом, представляется вероятным участие процесса дезамидирования в патогенезе сахарного диабета.

ЛИТЕРАТУРА

1. Кизильштейн А. Л., Пушкина Н. В. Влияние дезамидирования сывороточного альбумина на скорость его выведения из организма животных // Рукопись депонир. в ВИНТИ № 5037-83.
2. Кричевская А. А., Лукаш А. И., Пушкина Н. В., Шерстнев К. Б. // *Вопр. мед. химии.* — 1978. — № 2. — С. 160—163.
3. Лукаш А. И., Шепелев А. П., Пушкина Н. В. и др. // Там же. — 1985. — № 4. — С. 104—108.
4. Маурер Г. Диск-электрофорез: Пер. с нем. — М., 1971.
5. Петров В. Н. // Физиология системы крови: Физиология эритропоэза. — Л., 1979. — С. 172—210.

6. Пушкина Н. В. // *Укр. биохим. журн.* 1979. — Т. 51, № 6. — С. 680—683.
7. Пушкина Н. В., Лукаш А. И. // *Изв. Сев.-Кавказ. науч. центра высш. школы: Естеств. науки.* — 1976. — № 2. — С. 95—97.
8. Цыбульский И. Е. Изменение свойств и функций некоторых белков при дезамидировании: Автореф. дис. ... канд. биол. наук. — Ростов-н/Д., 1985.
9. Charache S., Fox J., McCurdy P. et al. // *J. clin. Invest.* — 1977. — Vol. 59, N 4. — P. 652—658.
10. Eble A. S., Thorpe S. R., Baynes J. W. // *J. biol. Chem.* — 1983. — Vol. 258, N 15. — P. 9406—9412.
11. Kohn R. R., Hamlin C. R. // *Genetic Effects on Aging* / Ed. D. Bergsma, D. Harrison. — New York, 1978. — P. 387—401.
12. Krishnamoorthy R., Gacon G., Labie D. // *FEBS Lett.* — 1977. — Vol. 77, N 1. — P. 99—101.
13. Meloun B., Moravek L., Kostka V. // *Ibid.* — 1975. — Vol. 58, N 1. — P. 134—137.
14. Monnier V. M., Kohn R. R., Cerami A. // *Proc. nat. Acad. Sci. USA.* — 1984. — Vol. 81, N 2. — P. 583—587.
15. Morgenthaler J. J., Nidegger U. E. // *Int. J. Artif. Organs.* — 1984. — Vol. 7, N 1. — P. 27—34.
16. Oimomi M., Hatanaka H., Ishikawa K. et al. // *Arch. Geront. Geriatr.* — 1984. — Vol. 3, N 1. — P. 59—64.
17. Parker K. M., England J. D., Da Costa J. et al. // *Clin. Chem.* — 1981. — Vol. 27, N 5. — P. 669—672.
18. Pongor S., Ulrich P. C., Bencsath F. A., Cerami A. // *Proc. nat. Acad. Sci. USA.* — 1984. — Vol. 81, N 9. — P. 2684—2688.
19. Schnider S. L., Kohn R. R. // *J. clin. Invest.* — 1981. — Vol. 67, N 6. — P. 1630—1635.
20. Tokuzo I., Chiromu I., Holland F. // *J. Amer. Ass. clin. Chem.* — 1968. — Vol. 14, N 1. — P. 22—30.

Поступила 03.09.86

THE RATE OF BLOOD PROTEINS AMIDATION IN HYPERGLYCEMIA CAUSED BY ALLOXAN DIABETES

N. V. Pushkina, I. E. Tsybulsky, A. I. Lukash

Chair of Biochemistry and Biotechnology, State University, Rostov-on-Don

Rates of amidation of blood serum albumin and hemoglobin was studied in hyperglycemia developed during alloxan diabetes mellitus. Content of glucose in blood of the animals with diabetes exceeded 5.2-fold its level in blood of controls; amount of glycosylated hemoglobin was increased by 41.7 %. Concentration of total, readily and hardly hydrolyzed amide groups was decreased in hemoglobin of the impaired animals by 13.1 %, 17.6 % and 10.4 %, respectively, as compared with control group. The degree of blood serum albumin amidation was not altered. Hyperglycemia, accompanied by glycosylation of proteins, was the most probable cause of accelerated deamidation of hemoglobin. Participation of the protein deamidation in pathogenesis of diabetes mellitus is discussed.