

М. В. БАВИНА и М. Г. КРИЦМАН

## ИССЛЕДОВАНИЕ БЕЛКОВОГО ОБМЕНА ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ АТЕРОСКЛЕРОЗЕ

### ЭЛЕКТРОФОРЕТИЧЕСКОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ БЕЛКОВЫХ ФРАКЦИЙ КРОВИ ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ АТЕРОСКЛЕРОЗЕ

(Представлено академиком Н. Н. Аничковым 4 XI 1952)

После того как нами были установлены существенные изменения в белковом обмене при экспериментальном атеросклерозе, исходя из особой роли белков крови в общем метаболизме органов и тканей, представляло интерес исследовать белковые фракции крови при данном заболевании.

В последние годы при помощи физико-химических методов было установлено (<sup>1</sup>, <sup>2</sup>), что при развитии атеросклеротического процесса происходит накопление в крови  $\beta$ -липопротеидов, представляющих собой комплексное соединение  $\beta$ -глобулина с различными липидами.

Задачей настоящего исследования было выяснить, ограничиваются ли нарушения в белковых фракциях крови повышенным образованием комплексного соединения  $\beta$ -глобулина с липидами или при развитии атеросклероза происходят и другие качественные и количественные изменения в белковых фракциях крови.

Для выяснения данного вопроса нами были предприняты исследования альбумина,  $\alpha_1$ -,  $\alpha_2$ -,  $\beta$ - и  $\gamma$ -глобулинов в сыворотке крови здоровых и атеросклеротических кроликов методом электрофоретического разделения белков на бумаге.

В настоящем сообщении приводятся данные, характеризующие качественные и количественные изменения белковых фракций сыворотки крови при экспериментальном атеросклерозе кроликов.

Объектом исследования служили самцы весом в 2,5 кг, породы Шеншилла. Опыты проводились на 2 группах животных; первую группу составляли здоровые кролики, вторую — атеросклеротические.

Атеросклероз вызывался по методу Н. Н. Аничкова путем кормления животных, находившихся на обычном растительном питании, раствором холестерина в подсолнечном масле из расчета 200 мг на 1 кг веса животного. Кормление производилось через рот ежедневно. Когда у кроликов, получавших холестерин, была достигнута стойкая гиперхолестеринемия и предполагалось развитие существенных изменений артерий, у них из ушной вены бралась кровь и в сыворотке определялись белковые фракции методом электрофоретического разделения на бумаге.

Электрофоретическое разделение белков на бумаге производилось в стеклянной закрытой камере, насыщенной водяными парами. Применялись полоски фильтровальной бумаги (ватман № 1) шириной 6 см, длиной 35—40 см, пропитанные буфером, в котором происходил электрофорез. Для анализа белковых фракций крови мы обычно брали 0,005 мл свежеполученной сыворотки крови. Это количество исследуемого мате-

риала наносилось на полоску увлажненной фильтровальной бумаги, которая свободно подвешивалась на горизонтально укрепленной в камере стеклянной палочке.

Концы полоски фильтровальной бумаги погружались в налитый в два цилиндрических стакана буферный раствор, с pH 8,6, ионной силы 0,1. В эти стаканы вставлялись два особого устройства угольных электрода, через которые проходил постоянный ток, получаемый от высоковольтного выпрямителя. Напряжения на электродах было в пределах 280 в, величина тока 1,5—2 ма, время электрофореза 16—20 час.

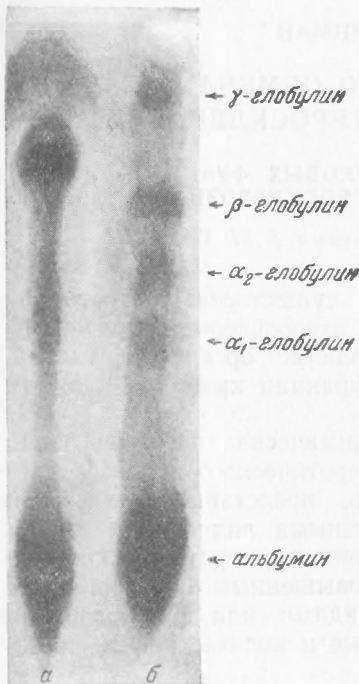


Рис. 1. Хроматограмма белковых фракций в сыворотке здорового (а) и атеросклеротического (б) кроликов

Как известно, белковые фракции крови при электрофорезе передвигаются к аноду с различной скоростью, обусловленной величиной их заряда. Однако  $\gamma$ -глобулины показывают заметное движение в сторону катода в силу электроосмоса, действующего в этом направлении. Для преодоления его оказалось целесообразным уровень раствора буфера в катодном пространстве держать на 1—2 см выше, чем в анодном.

По окончании электрофореза полоски фильтровальной бумаги высушивались при  $105^\circ$  в течение 20—30 мин. и окрашивались 0,05% раствором бромфенолблау в 1%  $\text{HgCl}_2 + 2\%$   $\text{CH}_3\text{COOH}$  в продолжение 5 мин. Избыток краски удалялся многократным промыванием 0,5%  $\text{CH}_3\text{COOH}$ . Полоски фильтровальной бумаги вторично высушивались на воздухе, и по проявившимся пятнам судили об отдельных белковых фракциях.

В наших опытах для получения вполне сопоставимых данных разделение белков сыворотки крови опытных и контрольных животных производилось одновременно на общей полоске бумаги. По расположению и интенсивности пятен создавалось представление о сдвиге в белковых фракциях.

Рис. 1 показывает, что при электрофоретическом разделении белков сыворотки крови здоровых кроликов (рис. 1, а) отчетливо обнаружилось на бумаге пять последовательно расположенных пятен, соответствующих белковым фракциям: альбумину,  $\alpha_1$ -,  $\alpha_2$ -,  $\beta$ - и  $\gamma$ -глобулинам.

В сыворотке крови атеросклеротических животных в этих же условиях не происходило такого четкого разделения белков. Из рис. 1, б видно, что не произошло разделения  $\alpha_2$ - и  $\beta$ -глобулинов в крови атеросклеротических животных, кроме того, значительно уменьшилось количество альбумина при одновременном увеличении  $\gamma$ -глобулина.

Для точного количественного определения отдельных фракций белков проявленные полоски фильтровальной бумаги разрезались на строго определенные узкие участки, шириной 0,5 см, которые помещались в отдельные пробирки для экстракции. Экстрагирование производилось 1 мл смеси равных объемов метилового спирта и 8% раствора  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  в течение 1 часа. После этого окрашенный раствор из каждой пробирки переносился в микрокювету толщиной в 1 см и колориметрировался на фотоэлектроколориметре. Применялись желатиновые фильтры № 606 с максимумом поглощения в области 555—610 м $\mu$ . Данные фотометрирования откладывались на оси абсцисс и пересчитывались по калибровочной кривой. Суммируя точки каждого пика, находили количество белка каждой фракции. Рис. 2 иллюстрирует типичную диаграмму разделения бел-

ков сыворотки крови здоровых и атеросклеротических кроликов. Полученные цифры, выраженные в процентах по отношению к количеству общего белка в сыворотке крови, приведены в табл. 1.

Данные табл. 1 показывают, что при развитии экспериментального холестеринного атеросклероза происходят значительные количественные изменения в отдельных белковых фракциях крови. Отчетливо видно падение концентрации альбумина, увеличение  $\beta$ - и  $\gamma$ -глобулинов. Содерж-

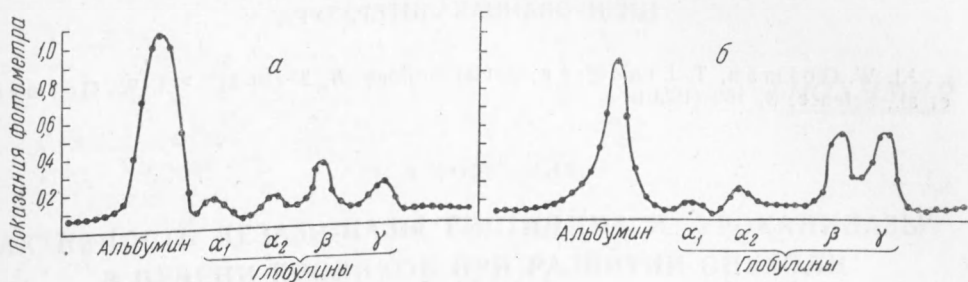


Рис. 2. Диаграмма электрофореза белков сыворотки крови здорового (а) и атеросклеротического (б) кроликов

жание  $\beta$ -глобулина в крови здоровых кроликов колебалось в пределах 7—15%. В крови атеросклеротических животных процентное содержание этой фракции значительно возрастало, и в тех случаях, когда происходило отчетливое разделение фракций, количество  $\beta$ -глобулина составляло не менее 20% всего количества белков сыворотки крови. То же можно сказать относительно  $\gamma$ -глобулина. Однако в большинстве случаев эти

Таблица 1

Изменения белковых фракций крови при экспериментальном атеросклерозе

Исследованные белковые фракции в сыворотке крови	Исследованные кролики									
	Здоровые					Атеросклеротические *				
	1	2	3	4	5	1 (++++)	2 (++++)	3 (+++)	4 (+++)	5† (+++)
Альбумин . . .	63,9	69,3	69,0	56,1	55,5	52,0	36,4	50,4	48,9	49,1
$\alpha_1$ -глобулин . . .	7,1	7,3	5,7	8,2	6,2	7,4	} 16,0	2,2	4,3	4,2
$\alpha_2$ -глобулин . . .	3,9	7,5	5,1	8,2	10,9	5,3		5,6	10,4	8,4
$\beta$ -глобулин . . .	11,3	6,9	12,2	15,6	13,9	} 35,3	} 47,6	19,8	} 36,4	20,4
$\gamma$ -глобулин . . .	14,0	9,0	8,0	11,9	13,5			21,2		17,9

\* +++ и ++++ указывают на степень атеросклероза аорты.

фракции белков крови не удавалось отделить друг от друга. Судить о них можно только по их сумме, которая значительно превосходила величину этих фракций у здоровых кроликов.

Таким образом, приведенные нами данные показывают, что развитие экспериментального холестеринного атеросклероза сопровождается не только повышенным комплексобразованием  $\beta$ -глобулина с липидами, как это указано в литературе, но при этом имеет место более глубокое нарушение в белковых фракциях крови, проявляющееся в падении концентраций альбумина и нарастании, кроме  $\beta$ -глобулина, также  $\gamma$ -глобулина.

Отмеченные нами нарушения в белковых фракциях крови при атеросклерозе могли явиться результатом специфического действия избыточ-

ного количества свободных и связанных липидов на ферментные системы, катализирующие образование и распад белковых фракций крови.

Институт терапии  
Академии медицинских наук СССР

Поступило  
16 X 1952

#### ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

<sup>1</sup>I. W. Gofman, T. Lindgren, J. Gerontology, 6, 2 (1951). <sup>2</sup> I. W. Gofman et al., Science, 3, 166 (1950).