

4. *Comparative study of the interaction of polyuridylic acid with 30S subunits and 70S ribosomes of Escherichia coli* / V. I. Katunin, Yu. P. Semenov, V. I. Makno, S. V. Kirillov.—*Ibid.*, N 2, p. 403—421.
5. *Sprinzl M., Sternbach H.* Enzymatic modification of the C—C—A terminus.—*Meth. Enzymol.*, 1979, 59, p. 182—190.
6. *Пешин Н. Н., Кириллов С. В.* Природа гетерогенности 30S рибосомных субчастиц *in vitro*. II. Два типа инактивации 30S субчастиц рибосом *Escherichia coli*.—*Молекуляр. биология*, 1979, 13, № 4, с. 752—759.
7. *Kirillov S. V., Makarov E. M., Semenov Yu. P.* Quantitative study of interaction of deacylation tRNA with *Escherichia coli* ribosomes.—*FEBS Lett.*, 1983, 157, N 1, p. 91—94.
8. *Rheinberger H. J., Sternbach H., Nierhaus K. H.* Three tRNA binding sites on *Escherichia coli* ribosomes.—*Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 1981, 78, N 9, p. 5310—5314.
9. *Grajevskaja R. A., Ivanov Yu. V., Saminsky E. M.* 70S ribosomes of *Escherichia coli* have an additional site for deacylated tRNA binding.—*Eur. J. Biochem.*, 1982, 128, N 1, p. 47—52.
10. *Кириллов С. В.* Механизмы кодон-антикодонного взаимодействия в рибосомах.— В кн.: *Итоги науки и техники. М.: ВИНТИ*, 1983, с. 5—97.— (Сер. Биологическая химия; т. 18).
11. *Кириллов С. В., Семенов Ю. П.* Взаимодействие тРНК с рибосомами.— *Молекуляр. биология*, 1984, 18, № 5, с. 1249—1263.
12. *Mechanism of codon-anticodon interaction in ribosomes* / S. V. Kirillov, K. Sh. Kemkhadze, E. M. Makarov et al.—*FEBS Lett.*, 1980, 120, N 2, p. 221—224.
13. *Odom O. W., Stöffler G., Hardesty B.* Movement of the 3'-end of 16S RNA towards S21 during activation of 30S ribosomal subunits.—*Ibid.*, 1984, 173, N 1, p. 155—158.
14. *Chiaruttini C., Milet M., Hayes D.* Structural differences between active and inactive 30S ribosomal subunits revealed by RNA—protein crosslinking.—*Ibid.*, p. 90—94.
15. *Ohsawa H., Gualerzi C.* Chemical modification *in situ* of *Escherichia coli* 30S ribosomal proteins by the site-specific reagent pyridoxal phosphate. Inactivation of the aminoacyl-tRNA and mRNA binding sites.—*J. Biol. Chem.*, 1983, 258, N 1, p. 150—156.
16. *Uhlenbeck O. C., Lowary P. T., Wittenberg W. L.* Role of the constant uridine in binding of yeast tRNA<sup>Phe</sup> anticodon arm to 30S ribosome.—*Nucl. Acids Res.*, 1982, 10, N 11, p. 3341—3352.
17. *Binding of complementary oligonucleotides to aminoacylated tRNA<sup>Phe</sup> from yeast* / O. Pongs et al.—*Biochem. and Biophys. Res. Commun.*, 1976, 71, N 4, p. 1025—1033.
18. *Crothers D. M., Cole P. E.* Conformational changes of tRNA.— In: *Transfer RNA* / Ed. S. Altman. London: MIT press, 1978, p. 197—247.
19. *Gassen H. G.* Ligand-induced conformational changes in ribonucleic acids.—*Progr. Nucl. Acid Res. and Mol. Biol.*, 1980, 24, p. 57—86.
20. *Nagamatsu K., Miyazawa Y.* Magnesium cation induced conformational change of yeast tRNA<sup>Phe</sup> as studied by singlet-singlet energy transfer.—*J. Biochem.*, 1983, 94, N 6, p. 1967—1971.

Отдел генетики растений АН МССР, Кишинев  
Ленинград. ин-т ядерной физики  
им. Б. П. Константинова АН СССР, Гатчина

Получено 09.04.85

УДК 547.963.3

## ИЗУЧЕНИЕ МОЛЕКУЛЯРНЫХ МЕХАНИЗМОВ ГИПОАЛЬБУМИНЕМИИ НА МОДЕЛИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО ИНФАРКТА МИОКАРДА

А. В. Лекис, Л. Ю. Лукошявичюс, М. И. Коваленко, О. В. Булдакова

Снижение количества альбумина в сыворотке крови при различных патологических состояниях, в том числе при инфаркте миокарда, показано как в клинических исследованиях, так и на различных экспериментальных моделях. Вместе с тем, молекулярные механизмы развития гипоальбуминемии практически не изучены. Согласно данным, полученным нами ранее [1], в первые сутки экспериментального инфаркта миокарда (ЭИМ) уменьшается доля мембраносвязанных рибосом в суммарном пуле рибосом печени. Как известно, с этим классом рибосом связан синтез сывороточного альбумина в клетках печени [2]. В настоящей работе изучен уровень синтеза альбумина и суммарных белков печени *in vivo* и *in vitro* и определено время синтеза «средней» полипептидной цепи в печени после ЭИМ.

**Материалы и методы.** Исследования проведены на кроликах-самцах массой 2,5—3,0 кг. Моделью экспериментального инфаркта миокарда служила окклюзия левой нисходящей ветви коронарной артерии. Торакотомия производилась под тиопенталовым наркозом (40 мг/кг), степень ишемии контролировали электрокардиографически [3]. Материалом для исследования служила печень животных через 6, 12 и 24 ч после окклюзии коронарной артерии и в те же сроки после торакотомии. В качестве контроля использовали печень интактных животных. Содержание белка определяли по методу Лоури [4]. Количество альбумина в сыворотке крови рассчитывали после ее фракционирования методом диск-электрофореза в ПААГ [5]. Для определения времени синтеза «средней» полипептидной цепи в печени, а также уровня синтеза суммарных белков и альбумина животным вводили внутривенно смесь  $^{14}\text{C}$ -аминокислот (240—360 мКи/ммоль) из расчета 1,6 мКи на 1 кг массы. Время синтеза «средней» полипептидной цепи определяли согласно методу [6]. Об уровне белкового синтеза судили по включению радиоактивной метки в ТХУ-нерастворимый осадок гомогената ткани через 15 мин после ее введения животным. Эндогенные аминокислоты-ТРНК были предварительно разрушены инкубацией гомогената ткани в 0,1 н. КОН при 37 °С. Уровень синтеза альбумина в печени определяли по включению меченых аминокислот в фракцию белков, осаждаемых антисывороткой к альбумину. Антисыворотку получали иммунизацией крыс высокоочищенным альбумином кролика [7]. Титр антител проверяли по реакции Оухтерлони [8]. Эквивалентную точку преципитации устанавливали, как описано [9]. Иммунопреципитацию альбумина проводили следующим образом: в пробу, содержащую 300 мкл гомогената ткани, добавляли 10 мкл альбумина (0,25 мг/мл) и 100 мкл антисыворотки с титром 1 : 4. Смесь инкубировали 1 ч при 37 °С и оставляли на ночь при 4 °С. Иммунопреципитаты собирали на нитроцеллюлозных фильтрах Сынпор (ЧССР) и тщательно отмывали 20 мМ калий-фосфатным буфером, pH 7,5, содержащим 0,14 М NaCl, 0,5 % тритона X-100. В контрольные пробы добавляли сыворотку неиммунизированных животных.

Для получения бесклеточной белоксинтезирующей системы печень гомогенизировали в 2,5 объемах 30 мМ HEPES-буфера (pH 7,5), содержащего 0,25 М сахарозу, 70 мМ KCl, 5 мМ ацетат магния, 0,25 мМ ЭДТА, 2 мМ дитиотреитол. Гомогенат центрифугировали 15 мин при 30 000 g и супернатант обозначали как «неочищенная S-30 фракция». Часть этой фракции фильтровали через гель сефадекса G-25 для освобождения от низкомолекулярных соединений и обозначали как «очищенная S-30 фракция». Стандартная инкубационная смесь в объеме 100 мкл содержала 30 мМ HEPES-буфер (pH 7,5), 0,5 мМ АТР, 0,02 мМ GTP, 10 мМ креатин-фосфат (КФ), 2 мкг креатин-фосфокиназы (КФК), 0,02 мМ раствор 19 немеченых аминокислот (исключая лейцин), 0,02 мМ  $^{14}\text{C}$ -лейцина (240 мКи/ммоль), 5 мМ ацетат магния, 120 мМ KCl, 2 мМ дитиотреитол и 1 опт. ед.  $A_{260}$ - $A_{320}$  очищенной S-30 фракции. В случае неочищенной S-30 фракции инкубационная смесь содержала те же компоненты, кроме АТР, GTP, КФ, КФК и немеченых аминокислот. Установлено, что для максимального образования продукта трансляции необходимо время инкубации 30 мин при 37 °С. Реакцию останавливали добавлением 0,5 мл 0,1 н. KOH, затем по истечении 20 мин инкубации при 37 °С к пробам добавляли 0,5 мл 10 %-ной ТХУ и выдерживали на ледяной бане 1 ч. Осадки наносили на нитроцеллюлозные фильтры и промывали 5 %-ной ТХУ. Уровень синтеза альбумина в бесклеточной белоксинтезирующей системе определяли с помощью иммунопреципитации [10]. Для этого из сыворотки крови крыс, иммунизированных альбумином кролика, осаждали сульфатом аммония фракцию  $\gamma$ -глобулинов [11]. Иммунопреципитаты собирали на нитроцеллюлозные фильтры, отмывали 50 мМ трис-HCl буфером (pH 7,5), содержащим 5 мМ  $\text{MgCl}_2$ , 100 мМ KCl, 0,5 % тритона X-100 и определяли радиоактивность в толуоловом сцинтилляторе в счетчике Delta-300. В контрольные пробы добавляли  $\gamma$ -глобулины, выделенные из сыворотки неиммунизированных животных.

**Результаты и обсуждение.** Согласно данным, представленным в табл. 1, в первые сутки ЭИМ, начиная с 6 ч, в сыворотке крови наблюдается снижение содержания как общего белка, так и альбумина. Одной из причин гипоальбуминемии при ЭИМ может быть снижение уровня синтеза в печени. В связи с этим предположением был определен уровень синтеза суммарных белков и альбумина в печени *in vivo*. Оказалось, что уже в первые часы после окклюзии коронарной артерии включение меченых аминокислот в ТХУ-нерастворимую фракцию гомогената печени и во фракцию белков, осаждаемых антиальбуминовой сывороткой, снижено (табл. 2). Процесс трансляции может быть охарактеризован с помощью определения времени синтеза «средней» полипептидной цепи. Изучение этого параметра показало его существенное увеличение при ЭИМ. Если в печени контрольных животных время синтеза «средней» полипептидной цепи составляет 3, 4 мин, то уже в первые часы ЭИМ оно возрастает, достигая наибольшей величины через 12 ч — 6,3 мин.

При сопоставлении данных, представленных в таблицах 1 и 2, видно, что уменьшению содержания альбумина в сыворотке крови при ЭИМ предшествует существенное снижение включения меченых аминокислот как в суммарные белки печени, так и в альбуминовую фракцию. Значительное возрастание времени синтеза «средней» полипептидной цепи также свидетельствует в определенной мере о снижении общей ско-

рости белкового синтеза в печени. Для выяснения причин обнаруженного явления дальнейшие исследования были направлены на изучение скорости и эффективности трансляции эндогенных мРНК в бесклеточных белоксинтезирующих системах из печени с использованием очищенной и неочищенной S-30 фракций. Бесклеточная белоксинтезирующая система, содержащая неочищенную S-30 фракцию, в большей мере отражает уровень синтеза белка в цитоплазме *in vivo*, так как в ней используются собственные ресурсы для синтеза белка. Согласно данным табл. 3, включение метки в продукт трансляции ниже в присутствии S-30 фракции, полученной из печени животных через 6—12 ч ЭИМ по сравнению с контролем. Возникает вопрос — связано ли снижение активности белоксинтезирующей бесклеточной системы из печени опытных животных с уменьшением энергетического обеспечения процесса трансляции или со снижением белоксинтезирующей способности самого аппарата трансляции. Для его решения была использована очищенная от низкомолекулярных соединений S-30 фракция и подобраны оптимальные концентрации АТР, ГТР, КФ и КФК в инкубационной смеси. Оказалось, что в таком варианте уровень синтеза белка в системе, выделенной из печени животных, уже через 6 ч после воспроизведения ЭИМ не только достигает контрольного уровня, но и превышает его (табл. 3).

Таблица 1

Содержание общего белка и альбумина в сыворотке крови кроликов при ЭИМ (мг/мл,  $M \pm m$ ,  $n=10-15$ )

Total protein and albumin content in rabbit serum during EIM (mg/ml,  $M \pm m$ ,  $n=10-15$ )

Контроль	Время ЭИМ, ч				
	6	12	24	48	72
Общий белок					
74,2±3,2	67,4±2,3*	66,5±2,5	58,9±3,2	58,2±2,0	69,6±3,3*
Альбумин					
37,1±2,6	31,1±3,3*	26,0±1,9	23,6±2,5	23,3±2,6	27,2±3,1*

Примечание. В таблицах 1—5 не приведены данные, полученные на торакотомированных животных, так как они идентичны данным контрольных животных. \* — Различия недостоверны.

Таблица 2

Включение  $^{14}\text{C}$ -аминокислот в суммарные белки печени и альбумин (имп/мин/10 мг белка,  $M \pm m$ ,  $n=3-5$ )

$^{14}\text{C}$ -amino acids incorporation into total proteins and albumin from rabbit liver (cpm/10 mg protein,  $M \pm m$ ,  $n=3-5$ )

Контроль	Время ЭИМ, ч		
	6	12	24
Суммарные белки			
3023±299	1640±310	1007±310	2357±396*
Альбумин			
904±29	425±35	335±34	580±38

Известно, что в первые сутки инфаркта миокарда нарушается энергетический обмен не только в сердечной мышце, но и в печени [12, 13]. В связи с этим можно предположить, что энергетическое обеспечение неочищенной белоксинтезирующей системы из печени при ЭИМ недостаточно для оптимального функционирования белоксинтезирующего аппарата. В плане проверки этого предположения было изучено включение  $^{14}\text{C}$ -лейцина в тотальный продукт трансляции при внесении в такую систему бесклеточного синтеза белка различных количеств АТР, ГТР и КФ. Увеличение в си-

стеме концентрации АТФ приводит к повышению синтеза белка, однако до определенной величины, которая не достигает контрольного уровня. Внесение в инкубационную смесь GTP практически не влияет на уровень включения меченой аминокислоты в продукт трансляции (данные не приведены). В то же время, при увеличении в инкубационной смеси КФ до 60 мМ уровень синтеза белка возрастает в неочищенной системе, выделенной из печени кроликов в различные сроки ЭИМ, превышает контрольный уровень (табл. 3).

Таблица 3

Включение  $^{14}\text{C}$ -лейцина в ТХУ-нерастворимый продукт трансляции в бесклеточных белоксинтезирующих системах из печени (пмоль/1 о. е. S-30,  $M \pm m$ ,  $n=14-18$ )

$^{14}\text{C}$ -leucine incorporation TCA-insoluble product of translation in rabbit liver cell free systems (pmoles/1 o. u. S-30,  $M \pm m$ ,  $n=14-18$ )

Вид системы	Контроль	Время ЭИМ, ч		
		6	12	24
Неочищенная S-30 фракция	2,22±0,27	1,54±0,28*	1,29±0,21	1,92±0,34*
Неочищенная S-30 фракция с добавлением 60 мМ КФ	5,23±0,55	7,06±0,69	7,79±0,98	6,65±0,96*
Очищенная S-30 фракция	9,57±0,48	11,47±0,95*	14,29±0,88	12,02±0,97

Таблица 4

Включение  $^{14}\text{C}$ -лейцина в альбумин, синтезированный в бесклеточной белоксинтезирующей системе из печени (пмоль/1 о. е. S-30,  $M \pm m$ ,  $n=8-10$ )

$^{14}\text{C}$ -leucine incorporation into the albumin synthesized in rabbit liver cell free systems (pmoles/1 o. u. S-30,  $M \pm m$ ,  $n=8-10$ )

Вид системы	Контроль	Время ЭИМ, ч		
		6	12	24
Очищенная S-30 фракция	3,24±0,16	2,88±0,24*	2,63±0,18	2,94±0,26*
Неочищенная S-30 фракция с добавлением 60 мМ КФ	2,38±0,15	2,07±0,22*	1,78±0,19	2,01±0,29*

Таблица 5

Соотношение продуктов трансляции, осаждаемых иммунопреципитацией и ТХУ ( $M \pm m$ ,  $n=8-10$ )

Ratio of translation products precipitated with antialbumine serum and trichloroacetic acid ( $M \pm m$ ,  $n=8-10$ )

Вид системы	Контроль	Время ЭИМ, ч		
		6	12	24
Очищенная S-30 фракция	0,33±0,02	0,26±0,01	0,20±0,02	0,24±0,02
Неочищенная S-30 фракция с добавлением 60 мМ КФ	0,45±0,05	0,29±0,07*	0,23±0,08	0,29±0,08*

При инфаркте миокарда в результате нарушения окислительного фосфорилирования в печени уменьшается количество АТФ и креатинфосфата [13]. В связи с этим внесение АТФ в неочищенную систему бесклеточного синтеза белка приводит, по-видимому, лишь к кратковременной компенсации недостатка энергетических ресурсов в процессе синтеза белка. Добавление КФ подключает креатинфосфокиназную систему, которая поддерживает содержание АТФ, а следовательно, и GTP на постоянном уровне. Известно, что отношение ADP/ATP и GDP/GTP весьма существенно для уровня и скорости белкового синтеза.

В следующей серии опытов был изучен уровень синтеза альбумина по отношению к общему уровню синтеза белков печени. Проведено сравнительное определение радиоактивности продуктов трансляции, осаждаемых ТХУ и иммунопреципитацией. Данные, приведенные в табл. 4 и 5, свидетельствуют о том, что при ЭИМ в бесклеточной белоксинтезирующей системе с очищенной и неочищенной S-30 фракцией снижается как абсолютный синтез альбумина, так и доля его в тотальном продукте трансляции. Наиболее низкий уровень синтеза альбумина наблюдается в белоксинтезирующих системах, полученных из печени через 12 ч ЭИМ. Повышенные концентрации КФ в инкубационной смеси приводит к увеличению синтеза только тотального продукта трансляции, но не изменяет уровня синтеза альбумина в системах, выделенных из печени при ЭИМ. Различия в уровне белкового синтеза в очищенной и неочищенной S-30 фракциях, по-видимому, связаны с наличием в последней низкомолекулярных ингибиторов трансляции [14].

Итак, обнаруженные при ЭИМ изменения уровня синтеза суммарных белков печени и альбумина, вероятно, обусловлены различными факторами. Если снижение синтеза белка в печени в целом при ЭИМ можно связать с недостатком энергетических ресурсов в клетке, то уменьшение синтеза альбумина нельзя объяснить только этой причиной. Выше отмечалось, что в первые 12 ч ЭИМ в печени вместе с изменением соотношения мембраносвязанных и свободных рибосом в пользу последних, происходит снижение доли полисомного материала в классе мембраносвязанных рибосом [1], на которых происходит синтез альбумина. Показано, что причиной снижения количества мембраносвязанных рибосом в печени при ишемии может быть уменьшение связывающей способности мембран [2]. Другой возможной причиной снижения уровня синтеза альбумина может быть уменьшение содержания соответствующих мРНК в результате их ускоренной деградации при ЭИМ. Есть данные, что регуляция деградации мРНК осуществляется на уровне мембран эндоплазматического ретикула [15]. Безусловно, для проверки справедливости высказанных предположений необходимы дальнейшие исследования.

#### STUDY OF THE MOLECULAR MECHANISMS OF HYPOALBUMINEMIA UNDER EXPERIMENTAL MYOCARDIAL INFARCTION

*A. V. Lekis, L. Yu. Lukoshevichius, M. I. Kovalenko, O. V. Buldakova*

Institute of Molecular Biology and Genetics,  
Academy of Sciences of the Ukrainian SSR, Kiev;  
Medical Institute, Lithuanian SSR, Kaunas

#### Summary

The decrease in the level of the total protein synthesis in the liver and an almost two-fold increase in the «average» polypeptide chain synthesis time are shown in the case of the experimental myocardial infarction (EMI). A considerable decrease in the incorporation of radioactive amino acids into albumin is established by means of immunoprecipitation with antialbumin serum. In cell-free systems it has been shown that a decrease in the total protein biosynthesis under EMI in liver is caused by the deficiency in the energy supply of the translation process, while reduction of the albumin synthesis in the case of EMI cannot be only due to this factor.

1. *Лекис А. В., Потапов А. П., Лукошявичюс Л. Ю.* Изменения в пуле рибосом в ранние сроки экспериментального инфаркта миокарда.— Молекуляр. биология, 1984, вып. 37, с. 22—25.
2. *Лишневецкая Е. В.* Мембраносвязанные рибосомы.— Успехи соврем. биологии, 1977, 83, № 2, с. 182—197.
3. *Mitochondrial functions in ischemic myocardium / A. Toleikis, P. Dzeja, A. Prashkevicius et al.— J. Mol. and Cell Cardiol., 1979, 11, N 1, p. 55—76.*
4. *Protein measurement with the folin reagent / O. Lowry, H. Rosenbrought, A. Farr et al.— J. Biol. Chem., 1951, 201, N 1, p. 265—275.*
5. *Ажицкий Г. Ю., Багдасарьян С. Н.* О возможности выделения мономерного иммунохимически чистого альбумина.— Лаб. дело, 1975, 12, с. 712—714.
6. *Лейтин В. Л., Лерман М. И.* Методы определения времени синтеза полипептидной цепи.— В кн.: Современные методы в биохимии. М.: Медицина, 1977, с. 277—285.
7. *Chemical and immunochemical characterization and major whey proteins of rabbit milk / R. Dayal, J. Hurliman, J. M. Suarf et al.— Biochem. J., 1982, 201, N 1, p. 71—79.*

8. *Ouchterlony O.* Cell-diffusion techniques in immunochemie. 15 Colloquium Ges. Physiol. Chem. Springer. Berlin, Heidelberg, New York, 1965, p. 13—35.
9. *Al-Sarra J. K., White D. A., Mayer R. J.* Immunochemical characterization of casein from rabbit mammary gland.— *Biochem. J.*, 1978, 173, N 4, p. 877—883.
10. *Роль функциональной адаптации тРНК в регуляции биосинтеза специфических белков* / А. В. Ельская, Г. В. Турковская, О. Т. Рожко, Н. Ф. Стародуб.— *Биохимия*, 1983, 48, № 4, с. 611—616.
11. *Лефковитс И., Перлис Б.* Иммуноглобулины крыс.— В кн.: *Методы исследований в иммунологии*. М.: Мир, 1981, с. 61.
12. *Гузеева В. А.* О патологии печени при инфаркте миокарда.— *Кардиология*, 1977, 17, № 1, с. 119—123.
13. *Прижизненное* изучение энергетического обмена печени у больных митральным стенозом / Е. Н. Мешалкин, Л. А. Кремлева, Г. Ф. Архипова и др.— Там же, 1977, 17, № 1, с. 54—57.
14. *Угарова Т. Ю.* Эукариотические бесклеточные белоксинтезирующие системы. В кн.: *Итоги науки и техники*. М.: ВИНТИ, 1976, с. 58—141. (Сер. Молекуляр. биология; Т. 7).
15. *Арбузов В. А.* Регуляция синтеза белка. Стабильность мРНК как один из факторов регуляции синтеза белка в клетках эукариотов.— *Успехи современ. биол.*, 1977, 83, № 2, с. 163—181.

Каунас. мед. ин-т МЗ ЛатвССР  
Ин-т молекуляр. биологии и генетики АН УССР,  
Киев

Получено 26.12.84