

Н. В. Родни, Н. М. Гусак, Т. Л. Левитина,
С. А. Атепалихина, Э. А. Козлов

ИССЛЕДОВАНИЕ ТРИПТИЧЕСКИХ ФРАГМЕНТОВ МАЛЕИЛ-ГРАНУЛИНА ВИРУСА ГРАНУЛЕЗА ОЗИМОЙ СОВКИ, AGROTIS SEGETUM

*Гранулин вируса гранулеза *A. segetum* малеилировали и расщепляли трипсином. Смесь фрагментов разделяли гель-фильтрованием, бутанольной экстракцией, ионообменной хроматографией и высоковольтным электрофорезом, а также хроматографией на бумаге. Определена частичная или полная аминокислотная последовательность 23 фрагментов. 12 фрагментов с уникальной аминокислотной последовательностью насчитывают 222 остатка аминокислот (90 % всей полипептидной цепи белка).*

В предыдущих публикациях [1—3] представлены результаты исследования триптических и химотриптических пептидов гранулина вируса гранулеза (ВГ) *A. segetum*. В настоящем сообщении рассматриваются результаты расщепления трипсином, разделения триптического гидролизата и выяснения строения полученных фрагментов гранулина, модифицированного малеиновым ангидридом.

Материалы и методы. Гранулин получали, растворяя гранулы в 67 %-ной уксусной кислоте по описанному ранее методу [4]. Выделенный таким способом белок окисляли по методу Хирса [5]. Окисленный гранулин малеилировали, как в работе [6]. Протеолиз трипсином («Worthington», США) осуществляли в 0,2 н. NH_4HCO_3 в течение 4 ч при 36 °С. Фермент-субстратное соотношение 1 : 100. В аналогичных условиях расщепляли триптический фрагмент химотрипсином («Serva», ФРГ). Метод удаления защитных групп описан в работе [6].

Для гель-фильтрования использовали сефадекс G-25 (тонкий) («Pharmacia», Швеция), TSK-GEL Toyopearl HW50M и HW40M («Toyo-Soda», Япония). Ионообменную хроматографию проводили на смоле TSK-GEL-ДЭАЭ-Toyopearl 650M («Toyo-Soda», Япония). Условия гель-фильтрования и ионообменной хроматографии приведены в подписях к соответствующим рисункам.

Пептиды экстрагировали следующим образом. Материал растворяли в 70 %-ной HCOOH , насыщенной *n*-бутанолом, добавляли равный объем *n*-бутанола, насыщенного 70 %-ной HCOOH , энергично встряхивали и центрифугировали при 2000 об/мин 10 мин. Бутанольную фракцию лиофилизировали.

Высоковольтный электрофорез (ЭФ) и бумажную хроматографию (БХ) проводили в электролитах (ЭФ1, ЭФ2) в системах (БХ1, БХ2) на бумаге FN17 («Filtrak», ГДР) в условиях, описанных ранее [1—3].

N-концевую аминокислотную последовательность пептидов определяли методом Эдмана с последующей идентификацией аминокислот в виде дансит(DNS)-производных. Деградицию осуществляли по Грью [7] в модификации Виноградовой [8]. DNS-аминокислоты идентифицировали на пластинках с тонким слоем полнамида [9]. Аминокислотный состав определяли, как описано ранее [1].

Результаты и обсуждение. Общая схема разделения триптических фрагментов малеил-гранулина приведена на рис. 1. Результаты отдельных этапов схемы представлены на рис. 2—5. В итоге очистки получены 25 фракций. Как было показано исследованием N-концевых последовательностей этих фракций, три из них (I, O, Э; II, P, G1, D2; III, T1, P, ЭФ1, БХ1, БХ2) содержали по 2—3 фрагмента, остальные представляли собой индивидуальные пептиды, аминокислотный состав которых приведен в табл. 1, а частичное или полное строение — в табл. 2.

Как видно из схемы разделения (рис. 1), некоторые фрагменты (Тм1, Тм2, Тм5, Тм5², Тм11) распределяются по нескольким фракциям, вероятно, из-за их склонности к совместной или самоассоциации, а также, возможно, ввиду различного содержания ароматических аминокислот. Так, например, благодаря склонности к самоассоциации, фрагмент Тм1 в чистом виде в небольших количествах был получен при

рехроматографии фракции IV. При этом, как видно из рис. 2, фрагмент Тм1 элюируется с колонки с фронтом растворителя, что свидетельствует о высокой степени ассоциации этого фрагмента (более 10 молекул в ассоциате). При гель-фильтрации смеси всех триптических

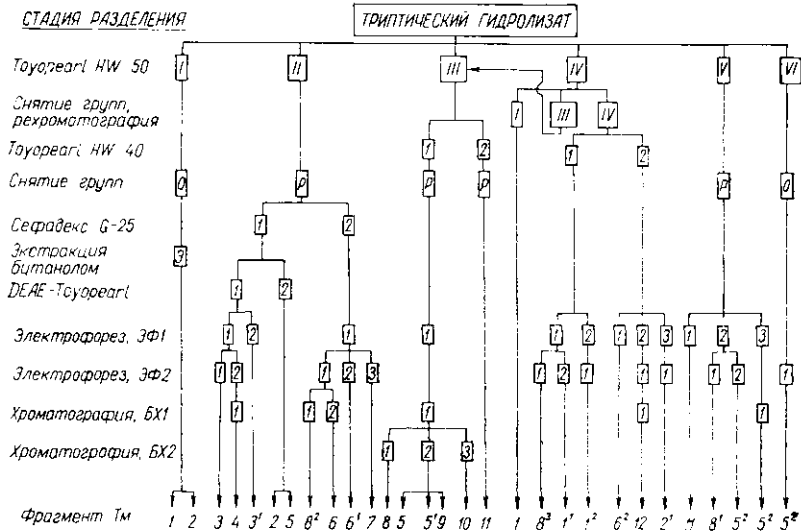


Рис. 1. Схема разделения триптических фрагментов малеилированного гранулина вируса гранулеза *A. segetum*

Fig. 1. Scheme for isolation of tryptic fragments of the maleylated granulin in *A. segetum* granulosis virus

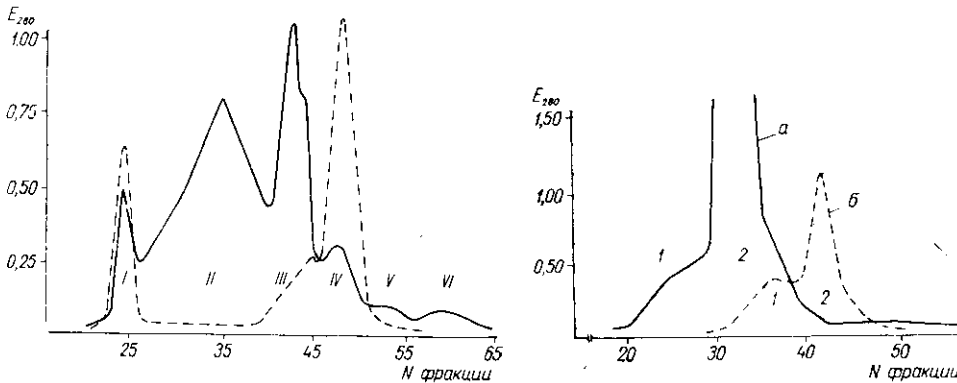


Рис. 2. Гель-фильтрация фрагментов триптического гидролизата малеилированного гранулина на колонке (2×90 см) с TSK-GEL Toyopearl HW50M в 0,2 н. NH_4HCO_3 . Скорость элюции 20 мл/ч, объем фракции 3 мл. Повторное гель-фильтрация материала пика IV обозначено штриховой линией

Fig. 2. Gel-filtration of tryptic fragments of the maleylated granulin on a column (2×90 cm) with TSK-GEL Toyopearl HW 50M in 0.2 N NH_4HCO_3 . Flow rate—20 ml/h, fragments of peak IV

Рис. 3. Гель-фильтрация материала пика III (а) и пика IV (б) (рис. 2) на колонке (2×90 см) с TSK-GEL Toyopearl HW40M в 0,2 н. NH_4HCO_3 . Скорость элюции 20 мл/ч, объем фракции 3 мл

Fig. 3. Gel-filtration of tryptic fragments of peak III (a) and peak IV (b) (Fig. 2) on a column (2×90 cm) with TSK-GEL Toyopearl HW 40M in 0.2 N NH_4HCO_3 . Flow rate—20 ml/h, fraction volume 3 ml

фрагментов малеил-гранулина основная масса Тм1 элюируется с фронтом в ассоциации с Тм2 (схема разделения, рис. 1). Не исключено, что Тм2 склонен и к самоассоциации.

Аминокислотный состав Тм1 рассчитывали, исходя из молекулярной массы фрагмента 8500, определенной электрофорезом в полиак-

риламидном геле (данные не приведены). По результатам секвенирования фракции I, O, Э можно выписать две N-концевые последовательности: Ile-Asp-Leu-Ser и Phe-Ile-Ser-Glx. Первая принадлежит фрагменту Тм1 (как определено на фракции IV, I), вторая совпадает с N-концевой последовательностью известного триптического пептида Т1 [3]. Зная аминокислотный состав Тм1 и фракции I, O, Э, можно рассчитать состав Тм2, который отличается от такового триптического пептида Т1 содержанием дополнительно остатков Tyr, Cys и Arg. Можно полагать, что Тм2 представляет собой пептид Т1, удлинённый с С-конца на фрагмент Тм2¹ (табл. 2).

Из результатов деградации по Эдману фракции II, P, G1, D2 очевидно, что она содержит два фрагмента с N-концевыми последовательностями Phe-Ile-Ser-Glx и Phe-Thr-Met-Glx. Первая принадлежит фраг-

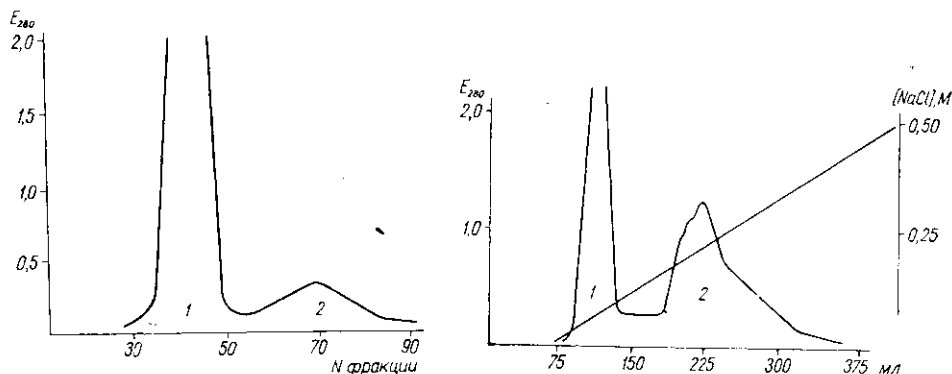


Рис. 4. Гель-фильтрация материала пика II (рис. 2) на колонке (3×90 см) с сефадексом G-25 в 0,2 N NH₄OH. Скорость элюции 30 мл/ч, объем фракции 5 мл

Fig. 4. Gel-filtration of tryptic fragments of peak II (Fig. 2) on a column (3×90 cm) with Sephadex G-25 in 0.2 N NH₄OH. Flow rate — 30 ml/h, fraction volume — 5 ml

Рис. 5. Разделение материала пика I (рис. 4) на колонке (1×25 см) с ДЭАЭ-Тоуоперл в стартовом буфере 0,05 М трис-НСl, рН 7,4, содержащем 6 М мочевины. Линейный градиент: 0→0,5 М NaCl в стартовом буфере. Скорость элюции 20 мл/ч

Fig. 5. Separation of tryptic fragments of peak I (Fig. 4) on a column (1×25 cm) with DEAE-Toyopearl in start 0.05 M Tris. HCl buffer, pH 7.4, containing 6 M urea. The linear gradient: 0→0.5 M NaCl in start buffer. Flow rate — 20 ml/h

менту Тм2. Зная аминокислотный состав Тм2 и фракции II, P, G1, D2, можно рассчитать состав фрагмента Тм5. Его отличие от аминокислотного состава известного ранее пептида Ch5 [3] заключается в содержании остатков Thr, Glx, Met и Phe. На этом основании можно предположить, что Тм5 представляет собой пептид Ch5, удлинённый с N-конца на фрагмент Тм5² (табл. 2).

Секвенирование фракции III, T1, P, ЭФ1, БХ1, БХ2 выявило две N-концевые последовательности: Phe-Thr-Met и Ala-Leu-Gly. Первая последовательность принадлежит фрагменту Тм5, вторая совпадает с N-концевой последовательностью химоотриптического пептида Ch5 [3], которому и идентичен, по-видимому, фрагмент Тм5¹ (табл. 2). Интересно отметить, что аминокислотный состав Тм5 равен сумме составов Ch5 и Тм5². Очевидно, что Тм5¹ образовался при расщеплении связи Tyr-Ala (табл. 2). Зная аминокислотные составы фракции III, T1, P, ЭФ1, БХ1, БХ2 и фрагментов Тм5 и Тм5¹, можно показать, что фракция содержит третий фрагмент Тм9, аминокислотный состав которого идентичен таковому триптического пептида Т23 [3]. Поскольку на N-конце Т23 находится остаток Gln, то отсутствие третьей N-концевой последовательности в рассматриваемой фракции можно объяснить циклизацией этого остатка в пирролидонкарбоновую кислоту.

Фрагмент Тм1 расщепляли химоотрипсином. Смесь разделяли высоковольтным ЭФ на бумаге в электролитах ЭФ1 и ЭФ2. Получили 12

пептидов, аминокислотные составы которых приведены в табл. 3, а частичное или полное строение — в табл. 4. Строение пептида Тм1Сн2 расписано на том основании, что пептид Тм1Сн2² идентичен фрагменту Тм1² (табл. 2), а Тм1¹ явно входит в состав пептида Тм1Сн2. Поскольку фрагмент Тм1 содержит один остаток Cys, то понятно, что пептиды Тм1Сн6, Тм1Сн6¹ и Тм1Сн6² происходят из одного участка Тм1.

Интересно отметить, что фрагменты Тм3 и Тм3¹ имеют одинаковые аминокислотные последовательности с единственной заменой Asp на Pro. Мы предполагаем, что оба фрагмента образовались из одного участка полипептидной цепи гранулина и являются отражением микрогетерогенности белка. Это вполне допустимо, так как гранулы выделяли из природной популяции насекомых. Микрогетерогенность была

Таблица 1

Аминокислотный состав триптических фрагментов малеил-гранулина вируса гранулеза озимой совки, *A. segetum*

Amino acid composition of tryptic fragments of maleylated granulin of the *A. segetum granulosis virus*

Аминокислота	Тм1	Тм1 ¹	Тм1 ²	Тм2 ¹	Тм3	Тм3 ¹	Тм4	Тм5 ²	Тм6
Lys	3,5(4)	1,8(2)					2,0(2)		0,9(1)
His	2,2(2)						1,3(2)		
Arg	1,0(1)			1,0(1)	1,0(1)	1,0(1)	1,6(2)		2,2(2)
Asp	6,9(7)		1,0(1)		1,0(1)	2,0(2)	4,2(4)		1,0(1)
Thr	2,0(2)						1,0(1)	0,9(1)	
Ser	3,0(3)						1,9(2)		
Glu	8,2(8)	1,2(1)			1,0(1)	1,0(1)	2,1(2)	1,3(1)	
Pro	5,6(6)		1,7(2)		1,0(1)				
Gly	3,4(3)						2,2(2)		1,1(1)
Ala	5,2(5)		1,0(1)				2,0(2)		
1/2 Cys	0,6(1)			1,0(1)			0,9(1)		
Val	6,1(6)		1,1(1)				1,1(1)		0,9(1)
Met	2,0(2)							0,9(1)	
Ile	6,1(6)	1,1(1)					2,0(2)		
Leu	6,1(6)		1,1(1)				1,1(1)		
Tyr	5,2(6)			1,0(1)			0,9(1)	0,8(1)	
Phe	7,6(8)	0,8(1)			0,9(1)	1,0(1)		1,0(1)	
Trp									
Всего	76	5	6	3	5	5	25	5	6
N-конец	Ile	Lys	Ala	Cys	Glu	Glu	His	Phe	Gly

Аминокислота	Тм6 ¹	Тм6 ²	Тм7	Тм8	Тм8 ¹	Тм8 ²	Тм8 ³	Тм10	Тм11	Тм12
Lys	1,0(1)		0,8(1)	2,5(3)		1,0(1)	0,9(1)			
His				0,7(1)						
Arg	1,0(1)	(1)	1,0(1)	3,0(3)		2,3(2)	1,1(1)	1,0(1)	1,2(1)	
Asp	1,1(1)		1,0(1)	1,6(2)				1,0(1)		1,0(1)
Thr				1,6(2)	0,8(1)					
Ser				0,8(1)					0,9(1)	
Glu				3,2(3)		0,9(1)	0,9(1)			
Pro			1,0(1)	1,0(1)						1,0(1)
Gly	1,0(1)		1,8(2)	0,9(1)						1,1(1)
Ala										
1/2 Cys				0,4(1)						
Val	0,9(1)		0,9(1)	1,2(1)						0,9(1)
Met										
Ile				3,1(3)	1,1(1)	0,8(1)	1,1(1)			
Leu				3,2(3)	1,2(1)				0,9(1)	
Tyr										
Phe				1,9(2)	0,9(1)					
Trp										
Всего	5	1	7	27	4	5	4	2	3	4
N-конец	Gly	—	Gly	Ile	Ile	Lys	Lys	Asp	Tyr	Val

обнаружена нами и при исследовании химотриптических пептидов гранулина [3].

Весьма интересен тот факт, что при гидролизе малеил-гранулина трипсином имеет место неспецифическое для трипсина расщепление по остаткам Tug (фрагмент Тм5²), Phe (Тм1¹, Тм8¹), Leu (Тм1²) и Asp (Тм12). Можно предположить, что протеолиз белка происходит самим трипсином, вероятнее всего, по остаткам Tug и Phe, но маловероятно, чтобы трипсин гидролизовал связи Leu-X и Asp-X. Мы не исключаем

Таблица 2

Частичная или полная аминокислотная последовательность триптических фрагментов малеил-гранулина вируса гранулеза озимой соеки, *A. segetum*

Partial or complete amino acid sequence of tryptic fragments of maleylated granulin of the *A. segetum granulosis virus*

Фрагмент	Формула очистки	Аминокислотная последовательность
Тм1	I, O, Э	Ile-Asn-Leu-Ser-(Lys ₄ , Arg, His ₂ , Asx ₆ , Thr ₂ , Ser ₂ , Glx ₃ , Pro ₆ , Gly ₃ , Ala ₅ , Cys, Val ₆ , Met ₂ , Ile ₃ , Leu ₅ , Tyr ₆ , Phe ₈)
Тм1 ¹	IV, IV, T1, ЭФ1, ЭФ2	Lys-Ile-Lys-Glu-Phe
Тм1 ²	IV, IV, T1, ЭФ1, ЭФ2	Ala-Pro-Asp-Val-Pro-Leu
Тм2	I, O, Э; II, P, G1, D2	Phe-Ile-Ser-Glx-(Arg ₂ , Asx ₃ , Thr ₂ , Glx ₆ , Pro ₃ , Met ₂ , Ile ₂ , Leu ₄ , Phe ₂)-Cys-Tyr-Arg
Тм2 ¹	IV, IV, T2, ЭФ1, ЭФ2	Cys-Tyr-Arg
Тм3	II, P, G1, D1, ЭФ1, ЭФ2	Glu-Asp-Pro-Phe-Arg
Тм3 ¹	II, P, G1, D1, ЭФ1	Glu-Asp-Asp-Phe-Arg
Тм4	II, P, G1, D1, ЭФ1, ЭФ2, БХ1	His-(Lys ₂ , His, Arg, Asx ₄ , Thr, Ser ₂ , Glx ₂ , Gly ₂ , Ala ₂ , Cys, Val, Ile ₂ , Leu, Tyr)-Arg
Тм5	II, P, G1, D2; III, T1, P, ЭФ1, БХ1, БХ2	Phe-Thr-Met-Gln-Tyr-Ala-Leu-Gly-(His ₂ , Asx ₂ , Pro, Ala ₂ , Val ₂ , Ile, Tyr)-Arg
Тм5 ¹	III, T1, P, ЭФ1, БХ1, БХ2	Ala-Leu-Gly-(His ₂ , Asx ₂ , Pro, Ala ₂ , Val ₂ , Ile, Tyr)-Arg
Тм5 ²	V, P, ЭФ1, ЭФ2; V, P, ЭФ1, БХ1; VI, O, ЭФ2	Phe-Thr-Met-Gln-Tyr
Тм6	II, P, G2, ЭФ1, ЭФ2 БХ1	Gly-Lys-Asp-Val-Arg-Arg
Тм6 ¹	II, P, G2, ЭФ1, ЭФ2	Gly-Lys-Asp-Val-Arg
Тм6 ²	IV, IV, T2, ЭФ1	Arg
Тм7	II, P, G2, ЭФ1, ЭФ2	Gly-Pro-Gly-Lys-Asn-Val-Arg
Тм8	III, T1, P, ЭФ1, БХ1, БХ2	Ile-Thr-Leu-Phe-Lys-Glu-Ile-Arg-Arg-Val-(Lys ₂ , His, Asx ₂ , Thr, Ser, Glx ₂ , Pro, Gly, Cys, Ile, Leu ₂ , Phe)-Arg
Тм8 ¹	V, P, ЭФ1, ЭФ2	Ile-Thr-Leu-Phe
Тм8 ²	II, P, G2, ЭФ1, ЭФ2, БХ1	Lys-Glu-Ile-Arg-Arg
Тм8 ³	IV, IV, T1, ЭФ1, ЭФ2	Lys-Glu-Ile-Arg
Тм9	III, T1, P, ЭФ1, БХ1, БХ2	Glu-(Asx ₂ , Glx ₂ , Pro ₂ , Gly ₂ , Val, Ile, Tyr ₂)-Arg
Тм10	III, T1, P, ЭФ1, БХ1, БХ2	Asp-Arg
Тм11	III, T2, P; V, P, ЭФ1	Tyr-Ser-Arg
Тм12	IV, IV, T2, ЭФ1, ЭФ2, БХ1	Val-Gly-Pro-Asn

Примечание. I—V, T1, G1— фракции, полученные при гель-фильтровании через TSK-GEL Toyopearl HW50, 40, сефадеке соответственно; D1— фракции, полученные при ионообменной хроматографии на ДЭАЭ-Toyopearl; P, O— раствор и осадок, получающиеся при снятии защитных групп; Э— экстракт бутанольный.

возможности расщепления гранулина протеазой, которая обнаружена нами в гранулах ВГ *A. segetum* [10]. Видимо, этот процесс может происходить внутри гранул при их хранении, ибо трудно предположить, чтобы такие жесткие модификации белка, как окисление и малеилирование, не инактивировали протеазу в препаратах гранулина.

Таким образом, из триптического гидролизата малеил-гранулина были выделены 23 фрагмента, насчитывающих в сумме 293 остатка аминокислот. Пептиды с уникальной последовательностью включают 222 остатка. Мы полагаем, что анализ результатов исследования триптических, химотриптических пептидов, опубликованных ранее [1—3], и триптических фрагментов модифицированного гранулина позволит реконструировать аминокислотную последовательность полипептидной цепи гранулина ВГ *A. segetum*.

Таблица 3

Аминокислотный состав химотриптических пептидов фрагмента Тм1
Amino acid composition of chymotryptic peptides of the Tm1 fragment

Аминокислота	Тм1Ch1	Тм1Ch1 ¹	Тм1Ch2	Тм1Ch2 ¹	Тм1Ch2 ²	Тм1Ch3
Lys	2,0(2)	2,0(2)	0,9(1)	2,0(2)		
His						
Arg						
Asp			1,1(1)		1,2(1)	
Thr						1,2(1)
Ser	1,0(1)	1,0(1)				
Glu			1,1(1)			
Pro			1,5(2)		1,6(2)	1,0(1)
Gly	0,9(1)					1,2(1)
Ala			1,0(1)		1,0(1)	0,7(1)
1/2 Cys						
Val			1,1(1)		1,1(1)	
Met						
Ile			1,1(1)	1,0(1)		
Leu			1,1(1)		1,2(1)	
Tyr	0,5(1)					0,6(1)
Phe			0,8(1)			0,7(1)
Trp						
Всего	5	3	10	3	6	6
N-конец	Ser	Ser	Ile	Lys	Ala	Phe

Аминокислота	Тм1Ch4	Тм1Ch5	Тм1Ch6	Тм1Ch6 ¹	Тм1Ch6 ²	Тм1Ch7
Lys						
His	0,8(1)					
Arg	1,0(1)					
Asp			1,0(1)	1,0(1)		
Thr			0,7(1)	0,8(1)	0,9(1)	
Ser		1,5(2)	1,0(1)	1,0(1)		
Glu		4,0(4)	1,0(1)	1,0(1)	1,2(1)	
Pro	1,0(1)		1,0(1)			
Gly			0,9(1)			
Ala		1,2(1)	1,0(1)			
1/2 Cys			0,4(1)	0,4(1)	0,7(1)	
Val		1,5(2)	1,1(1)	1,0(1)		1,2(1)
Met		0,5(1)				
Ile		3,5(4)				
Leu	1,2(1)		2,0(2)	1,0(1)	1,2(1)	
Tyr			2,3(3)	0,6(1)		
Phe		0,8(1)				
Trp						
Всего	4	15	14	8	4	2
N-конец	His	Ser	Gly	Thr	Thr	Val 0,8(1)

Таблица 4

Частичная или полная аминокислотная последовательность химотриптических пептидов фрагмента Тм1
 Partial or complete amino acid sequence of chymotryptic peptides of the Tm1 fragment

Пептид	Аминокислотная последовательность
Tm1Ch1	Ser-Lys-Lys-Gly-Tyr
Tm1Ch1 ¹	Ser-Lys-Lys
Tm1Ch2	Ile-Lys-Glu-Phe-Ala-Pro-Asp-Val-Pro-Leu
Tm1Ch2 ¹	Lys-Ile-Lys
Tm1Ch2 ²	Ala-(Asp, Pro ₂ , Val)-Leu
Tm1Ch3	Phe-(Thr, Pro, Gly, Ala)-Tyr
Tm1Ch4	His-Arg-Pro-Leu
Tm1Ch5	Ser-(Ser, Glx ₄ , Ala, Val ₂ , Met, Ile ₄ , Phe)
Tm1Ch6	Gly-Tyr-(Asn, Thr, Ser, Gln, Pro, Ala, Cys, Val, Leu ₂ , Tyr ₂)
Tm1Ch6 ¹	Thr-(Gln, Cys, Leu)-(Asn, Ser, Val, Tyr)
Tm1Ch6 ²	Thr-(Gln, Cys, Leu)
Tm1Ch7	Val-Tyr

INVESTIGATION OF TRYPTIC FRAGMENTS OF MALEYLATED GRANULIN OF THE AGROTIS SEGETUM GRANULOSIS VIRUS

N. V. Rodnin, N. M. Gusak, T. L. Levitina, S. A. Atepalikhina, E. A. Kozlov

Institute of Molecular Biology and Genetics,
 Academy of Sciences of the Ukrainian SSR, Kiev

Summary

The granulin of the *A. segetum* granulosis virus was maleylated and subjected to tryptic digestion. The fragments were separated by gel filtration, ion-exchange chromatography, butanol extraction and high-voltage paper electrophoresis and chromatography. Partial and complete amino acid sequence of the 23 fragments including 293 amino acid residues was determined. 12 unique fragments comprise 222 residues and account for 90 % of the granulin polypeptide chain.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Структура некоторых триптических пептидов гранулина вируса гранулеза озимой совки, *Agrotis segetum* / Т. Л. Левитина, С. Б. Серебряный, Н. В. Роднин, Э. А. Козлов // Биополимеры и клетка.— 1986.—2, № 1.— С. 30—35.
2. Структура некоторых химотриптических пептидов гранулина вируса гранулеза озимой совки, *Agrotis segetum* / Т. Л. Левитина, Н. В. Роднин, С. Б. Серебряный, Э. А. Козлов // Там же.— № 2.— С. 73—81.
3. Дополнительное исследование триптических и химотриптических пептидов гранулина вируса озимой совки, *Agrotis segetum* / Т. Л. Левитина, Н. В. Роднин, Н. М. Гусак и др. // Там же.— 1989.—5, № 6.— С. 52—60.
4. Кавсан В. М., Кацман М. С., Серебряный С. Б. Получение полиэдреного белка *Borrelinavirus bombycis* обработкой полиэдров уксусной кислотой // Микробиол. журн.— 1970.—32, № 3.— С. 355—358.
5. Hirs C. H. W. Determination of cystein as cystic acid // Meth. Enzymol.— 1967.—11.— Р. 55—62.
6. Триптические фрагменты малеилированного белка тел включений вируса ядерного полиэдроза тутового шелкопряда. I. Разделение и аминокислотный состав фрагментов / Э. А. Козлов, Т. Л. Левитина, М. С. Кацман, С. Б. Серебряный // Биоорг. химия.— 1978.—4, № 8.— С. 1029—1035.
7. Gray W. R. Sequence degradation plus dansylation // Meth. Enzymol.— 1967.—11.— Р. 469—475.
8. Первичная структура цитоплазматической аспаратаминотрансферазы из сердечной мышцы свиньи. Аминокислотная последовательность растворимых пептидов триптического гидролизата / Е. И. Виноградова, М. Ю. Фейгина, Ц. А. Алданова и др. // Биохимия.— 1973.—38, № 1.— С. 3—21.

9. Хроматография в тонком слое полиамида / П. Д. Решетов, Г. Г. Честухина, С. Махмутов, А. С. Пышкина // Химия природ. соединений.— 1971.— № 1.— С. 66—88.
10. Некоторые физико-химические свойства белка тел включений вируса ядерного полиэдруса и вируса гранулеза озимой совки, *Agrotis segetum* / Э. А. Козлов, Т. Л. Левитина, Н. М. Гусак, С. Б. Серебряный // Биополимеры и клетка.— 1985.— 1, № 3.— С. 121—124.

Ин-т молекуляр. биологии и генетики
АН УССР, Киев

Получено 27.03.89

УДК 616.132—004.6—09:616.132—02:577.122.856

**Р. З. Ваврин, А. С. Кузнецов, Н. С. Парфенова, В. А. Носкин,
Л. В. Оленикова, И. В. Криворученко, А. Ю. Сунгуров, Е. И. Коган,
Е. Я. Маграчева, Ю. И. Пивоварова**

РАЗМЕРЫ ЛИПОПРОТЕИДОВ НИЗКОЙ ПЛОТНОСТИ У ПАЦИЕНТОВ С ИШЕМИЧЕСКОЙ БОЛЕЗНЬЮ СЕРДЦА И НОРМОЛИПИДЕМИЕЙ *

Сопоставлены свойства обычных по размеру ($R=9,8\pm 0,1$ нм) и мелких ($R=7,6\pm 0,1$ нм) липопротеидов низкой плотности (ЛПНП) здоровых людей и мелких липопротеидов этого же класса ($R=7,7\pm 0,1$ нм) пациентов с ишемической болезнью сердца (ИБС). Установлено, что у здоровых лиц мелкие ЛПНП более склонны к агрегации, чем обычные. С другой стороны, мелкие ЛПНП больных ИБС еще более нестабильны, чем мелкие ЛПНП здоровых лиц. Предположено, что нестабильность ЛПНП может быть фактором риска ИБС.

Введение. Взаимосвязь между дислиппротеинемиями в ИБС общеизвестна. Вместе с тем особый интерес представляет это заболевание у пациентов с нормолипидемией. В частности, описан синдром гиперapo-B-липопроteinемии, типичный для этой группы больных. Синдром характеризуется относительным обеднением частиц ЛПНП липидами и обогащением белковыми компонентами [1], а также увеличением как скорости синтеза, так и элиминации из кровотока [2].

Цель данной работы состояла в изучении размеров ЛПНП и свойств их поверхности у пациентов с ИБС, сопровождающейся нормолипидемией, по сравнению со здоровыми людьми.

Материалы и методы. Кровь получали от лиц без клинических признаков ИБС и от пациентов с ИБС, документированной коронаро- и кардиографически. Выделение ЛПНП и комплекс различных методов, позволяющих получить информацию о размерах, заряде, свойствах поверхности, стабильности, конформации белка и взаимодействии липопротеидов (ЛП) с макрофагами, описаны ранее [3—7].

Результаты и обсуждение. Из данных табл. 1 видно, что пациенты с ИБС имеют близкие уровни суммарных триглицеридов и α -холестерина со здоровыми людьми, а уровень общего холестерина достигает верхней границы нормы (250 мг/дл). То есть ИБС у этих пациентов сопровождается или нормолипидемией, или умеренной гиперхолестеринемией.

При анализе с помощью лазерной корреляционной спектроскопии были выявлены три типа распределений ЛПНП по радиусу (R) (рис. 1). Для типа *A* характерно преобладание частиц с $R=9—11,5$ нм (среднечисленный $R=9,8$ нм). В случае типа *B* отмечался сдвиг в сторону преобладания мелких ЛПНП с $R=7—9$ нм ($\bar{R}_N=7,7$ нм). При типе *B* увеличивалась доля как частиц с $R=7—9$, так и 11,5—15,0; 15—21 нм по сравнению с типом *A* ($\bar{R}_N=9,8$). То есть при типе *B* значение среднечисленного радиуса одинаково с типом *A*.

* Представлена членом редколлегии В. М. Кавсаном.