

6. De Kretser D.M. // *Rep rod. Fertil. Dev.* - 1998. - Vol. 10. - P. 93-95.
7. Irvine S. // *Brit. Med. Journal.* - 1996. - Vol. 312. - P. 1557-1558.
8. Pajarinen J., Savolainen V., Perola M. et al. // *Int. J. Androl.* - 1996. - Vol. 19. - P. 155-163.
9. Pajarinen J., Laippala P., Penttila A., Karhunen P.J. // *Brit. Med. J.* - 1997. - Vol. 314. - P. 13-18.
10. Suominen J., Vierula M. // *Brit. Med. J.* - 1993. - Vol. 306. - P. 1579.
11. Vierula M., Niemi M., Keiski A. et al. // *Int. J. Androl.* - 1996. - Vol. 19. - P. 11-17.
12. Vines G. // *New Scient.* - 1995. - Vol. 147. - P. 23-25.

Поступила в редакцию 08.11.05.

#### CONTEMPORARY TENDANCIES OF CHANGES IN SPERMATOGENIC ACTIVITY IN THE MALE POPULATION OF PRIMORYE REGION

O.A. Dmitrieva, Yu.A. Averyanov, V.P. Solov'yov, L.N. Ivanenko

Vladivostok State Medical University, Primorsky Regional Bureau of Medical Expertise, Clinic «Yaroslava» (Vladivostok)

*Summary* — On the basis of clinical (172 patients) and morphological (the material of 50 autopsies) material it is found, that the ratio of male with oppressed spermatogenesis in the fertile age population of Primorski Krai prevails on male with the normal spermatogenesis. It is obvious, that the received data reflect the common process of decrease spermatogenic human functions, which is found all over the world.

*Pacific Medical Journal*, 2006, No. 2, p. 67-70.

УДК 615.272:546.41:582.272

М.Ю. Петракова, Н.Е. Ламаш,  
Ю.С. Хотимченко

### ОЦЕНКА БЕЛКОВОСВЯЗЫВАЮЩИХ СВОЙСТВ АЛЬГИНАТА КАЛЬЦИЯ

Владивостокский государственный медицинский университет,  
Институт биологии моря ДВО РАН (г. Владивосток)

*Ключевые слова:* альгинат кальция, изотерма адсорбции, иммуноглобулин, гиалуронидаза.

Альгинаты — природные полисахариды, которые являются структурными компонентами клеточных стенок бурых водорослей. Они представляют собой линейные полимеры, состоящие из остатков Р-D-маннуриновой и а-L-гулуриновой кислот, соединенных 1—4 гликозидными связями [2]. Уникальная способность альгинатов к образованию вязких и гелеобразных растворов, биосовместимость и сорбционные свойства позволяют применять эти полисахариды в качестве матрицы для удерживания протеинов, ферментов и целых микробных клеток растений и животных для последующего освобождения захваченных веществ [4—6, 8]. На скорость высвобождения удерживаемого вещества влияют различные внешние факторы. Поэтому при создании комплексных препаратов на основе альгината кальция предварительным этапом является определение параметров, которые влияют на поведение этого полисахарида при таком применении.

Цель работы — оценить белковосвязывающие свойства альгината кальция в отношении иммуноглобулина и гиалуронидазы в зависимости от времени, концентрации и рН среды.

В работе использовались следующие препараты: «Имуноглобулин человека нормальный» (НПО «Микроген», г. Москва), «Лидаза», содержащий гиалуронидазу (НПО «Микроген», г. Москва), и альгинат кальция (НПФ «Востокфарм»). Последний

имел следующие характеристики: содержание урновых кислот — 77,3%, содержание кальция — 72,5%, 82,5% карбоксильных групп были представлены в виде кальциевой соли, характеристическая вязкость 1270 мл/г, молекулярная масса 403 кДа.

В кинетических экспериментах адсорбцию белка из раствора проводили в герметично закрывающихся центрифужных пробирках объемом 10 мл. К навескам альгината кальция массой 0,05 г добавляли 0,1% водный раствор белка объемом 10 мл. Смесь непрерывно встряхивали при 120 оборотах в минуту. Через определенные промежутки времени пробы отбирали и центрифугировали при 10000 оборотах в течение 10 мин.

Концентрацию белка в надосадочной жидкости определяли спектрофотометрическим методом при  $\lambda=280$  нм. Сорбционную емкость рассчитывали по формуле:

$$Q = (C_i - C_f) / S,$$

где S — навеска альгината кальция в г, V — объем раствора белка в л, Q Н С , - начальная и конечная концентрации белка в растворе соответственно, в мг/л.

При расчете сорбционной емкости учитывали собственное светопоглощение водного извлечения из альгината кальция, приготовленного параллельно в идентичных условиях. Для построения изотерм адсорбции при комнатной температуре одинаковые навески альгината кальция помещали в растворы, содержащие разное количество сорбируемого белка. Через время, необходимое для установления равновесия, определяли равновесные концентрации сорбируемого белка и для каждой концентрации рассчитывали сорбционную емкость альгината кальция. Полученные результаты наносили на график, где на оси ординат откладывали сорбционную емкость альгината, а на оси абсцисс — соответствующие им значения равновесных концентраций белка (Ceq).

Для исследования зависимости сорбционной емкости альгината кальция от рН использовали следующие буферные растворы: 0,2М ацетатный

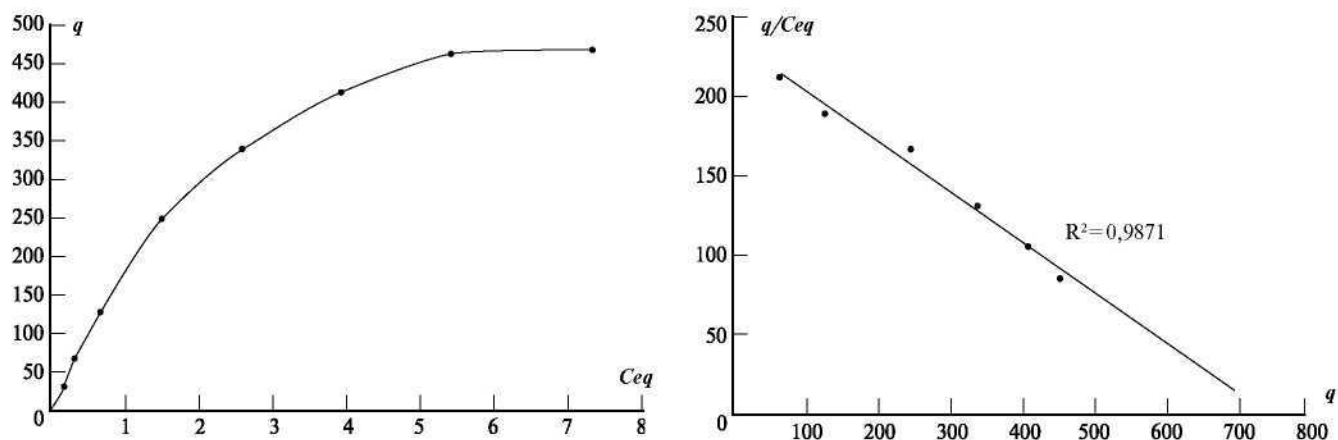


Рис. 1. Адсорбция иммуноглобулина альгинатом кальция.

Слева – изотерма адсорбции: по оси абсцисс –  $C_{eq}$  (мг/мл), по оси ординат –  $q$  (мг/г); справа – изотерма адсорбции в координатах Скэтчарда: по оси абсцисс –  $q$  (мг/г), по оси ординат –  $q/C_{eq}$  (г/мл).

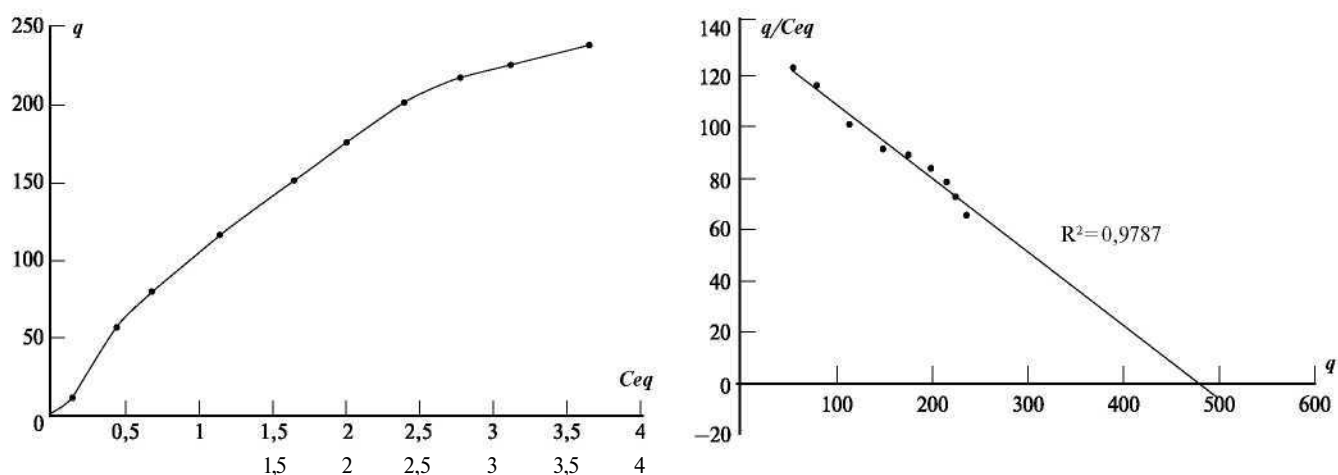


Рис. 2. Адсорбция гиалуронидазы альгинатом кальция.

Слева – изотерма адсорбции: по оси абсцисс –  $C_{eq}$  (мг/мл), по оси ординат –  $q$  (мг/г); справа – изотерма адсорбции в координатах Скэтчарда: по оси абсцисс –  $q$  (мг/г), по оси ординат –  $q/C_{eq}$  (г/мл).

(рН 4,0-5,0); трис-буфер (рН 7,0-9,0) и буфер, содержащий 2-(N-морфолино) этансульфоновую кислоту и NaOH (рН 6,0). Белок растворяли в соответствующем буфере и определяли равновесные значения сорбционной емкости.

Для оценки белковосвязывающих свойств альгината кальция предварительно исследовали кинетику сорбции. Время, необходимое для достижения адсорбционного равновесия, составило для иммуноглобулина 180 мин., а для гиалуронидазы – 30 мин. При увеличении времени взаимодействия дальнейшего роста сорбционной емкости не происходило. Более длительное установление равновесия между альгинатом кальция и иммуноглобулином, нежели между альгинатом и гиалуронидазой, может быть связано с большими размерами молекул иммуноглобулина.

Изотермы адсорбции иммуноглобулина и гиалуронидазы внешне были похожи по форме. Они оказались выпуклыми относительно оси абсцисс на начальном участке и имели пологий характер возрастания. При дальнейшем увеличении концентрации наблюдался выход кривых на плато, что свидетельствовало о насыщении поверхности альгината

белком (рис. 1, а; 2, а). Считают, что изотермы такой формы получаются, когда нет сильной конкуренции из растворителя или когда между сорбируемыми молекулами имеется сильное межмолекулярное взаимодействие [3]. Возможно, в нашем случае наблюдались оба этих процесса. С одной стороны, молекулы белка и молекулы воды полярны и между ними существует конкуренция за места связывания с полярным полисахаридом. Однако, скорее всего, эта конкуренция незначительная. С другой стороны, использованные белки – это вещества со средней (гиалуронидаза) и высокой (иммуноглобулин) молекулярной массой, которые за счет многочисленных связей между функциональными группами в водных растворах находятся в виде крупных ассоциированных частиц.

Форма полученных кривых позволяет отнести их к классу изотерм Лэнгмюра [3]. Основными показателями, характеризующими процесс сорбции, являются максимальная сорбционная емкость альгината кальция ( $q_{max}$ ) и коэффициент сродства между белком и альгинатом, или константа диссоциации (b). Для расчета этих величин использовали одну из линеаризированных форм уравнения Лэнгмюра –

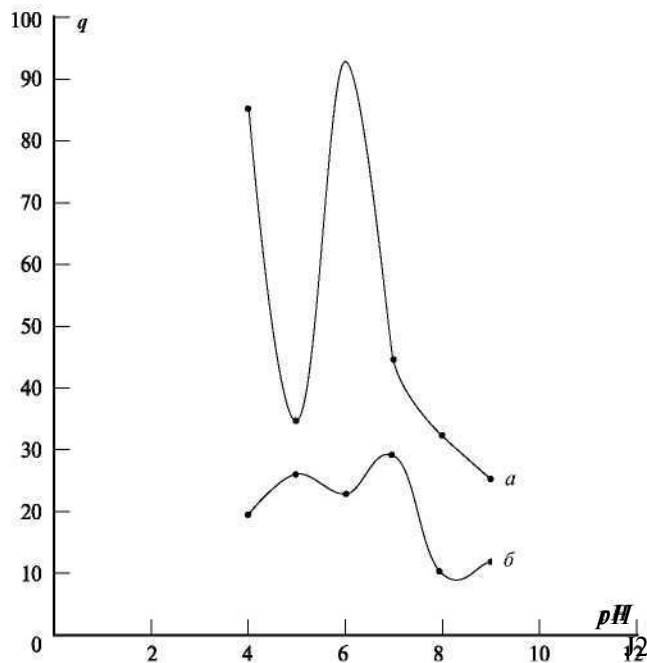


Рис. 3. Зависимость адсорбции иммуноглобулина и гиалуронидазы от pH.

а - иммуноглобулин; б - гиалуронидаза. По оси абсцисс - pH, по оси ординат - q (мг/г).

преобразование Скэтчарда. Согласно ему, если исследуемая зависимость действительно подчиняется уравнению Лэнгмюра, нанесенные по результатам эксперимента точки в координатах Скэтчарда ( $q/C_{eq}$ , q) должны укладываться на прямую, тангенс угла наклона которой будет равным  $1/b$ , а отрезок, отсекаемый прямой на оси абсцисс, непосредственно будет давать значение  $q_{max}$  [1].

Графики изотерм адсорбции иммуноглобулина и гиалуронидазы, построенные в координатах Скэтчарда, образовывали прямые линии с коэффициентами регрессии 0,99 для иммуноглобулина и 0,98 для гиалуронидазы (рис. 1, б; 2, б). Из графика Скэтчарда для иммуноглобулина было получено  $q_{max}=750$  мг/г,  $b=1,6$  мг/мл, для гиалуронидазы —  $q_{max}=475$  мг/г,  $b=1,4$  мг/мл. Максимальная сорбционная емкость иммуноглобулина оказалась примерно в 1,5 раза выше аналогичного показателя гиалуронидазы. Константа диссоциации иммуноглобулина была несколько выше, чем константа диссоциации гиалуронидазы, что указывает на большее сродство гиалуронидазы к альгинату кальция.

Максимальная адсорбция иммуноглобулина альгинатом кальция наблюдалась при pH 6, а гиалуронидазы — при pH 7 (рис. 3). В случае иммуноглобулина отмечено резкое снижение сорбционной емкости при pH 5 с последующим ее резким повышением, что, вероятно, обусловлено неоднородностью препарата этого белка, поскольку он содержит одновременно несколько классов иммуноглобулина. В случае гиалуронидазы рост сорбционной емкости шел параллельно с ростом отрицательного заряда полисахарида. Адсорбция белковых молекул

альгинатом кальция обусловлена электростатическими силами между положительно заряженными молекулами белка и отрицательно заряженным полисахаридом [7]. Заряд альгината нулевой при низких значениях pH, так как альгинат полностью протонирован. Затем происходил рост отрицательного заряда с ростом pH до максимальной степени и наступала полная депротонация при pH 6,5. Заряд белка меняется в зависимости от pH среды и бывает положительным ниже изоэлектрической точки, отрицательным выше и нулевым вблизи нее. В результате меняется сорбционная емкость полисахарида, которая растет в интервале pH между точкой нулевого заряда поверхности альгината и изоэлектрической точкой белка.

Таким образом, при изучении белковосвязывающих свойств альгината кальция в зависимости от времени, концентрации и pH среды получены количественные характеристики процесса сорбции белковых молекул альгинатом кальция, которые могут использоваться для сравнительной оценки эффективности различных сорбентов.

#### Литература

1. Мецлер Д. Биохимия. — М.: Мир, 1980.
2. Хотимченко Ю.С., Ковалев В.В., Савченко О.В. и др. // Биология моря. — 2001. — Т. 27, № 3. — С. 151-162.
3. Giles C.H., MacEwan T.H., Nakhwa S.N. et al. // J. Chem. Soc. - 1960. - No. 10. - P. 3973-3993.
4. Haque T., Chen H., Ouyang W. et al. // Int. J. Artif. Organs. - 2005. - Vol. 28. - P. 631-637.
5. Hurteaux R., Edwards-Levy F., Laurent-Maquin D. et al. // Eur. Journal Pharm. Sci. - 2005. - Vol. 24. - P. 187-197.
6. Kim B. Y., Jeong J. H., Park K et al. // J. Control. Release. - 2005. - Vol. 102. - P. 525-538.
7. Nicolas M., Velings and Michele M. // J. Bioactive and Compatible Polymers. - 1994. - Vol. 9. - P. 133-141.
8. Paek H.J., Campaner A.B., Kim J.L. et al. // ASAIO. J. - 2005. - Vol. 51. - P. 379-384.

Поступила в редакцию 22.11.05.

#### ESTIMATION OF THE PROTEIN-BINDING PROPERTIES OF CALCIUM ALGINATE

M. Yu. Petrakova, N.E. Lamash,  
Yu. S. Hotimchenko

Vladivostok State Medical University, Institute of Marine Biology of the Far-Eastern Branch of the Russian Academy of Sciences (Vladivostok)

Summary — An ability of calcium alginate to bind the immunoglobulin with hialuronidase in water solution is investigated depending on time, concentration and pH of the solution. The protein adsorption been described by the Langmuir equation. Absorption balance was found in 180 minutes for immunoglobulin and in 30 minutes for hialuronidase. Values of the maximal sorption capacity and dissociation constants were for immunoglobulin 750 mg/g and 1.6 mg/ml, and for hialuronidase 475 mg/g and 1.4 mg/ml, respectively. The adsorption of immunoglobulin was maximal at pH 6, and hialuronidase — pH 7.