

УДК 612.396.22.

*Н. К. Кравченко
О. М. Савчук
Л. І. Остапченко
І. О. Степанець*

Київський національний університет
імені Тараса Шевченка, м. Київ

ВПЛИВ ФРАКЦІЇ IGG ЩУРІВ ІЗ ХРОНІЧНОЮ АЛКОГОЛЬНОЮ ІНТОКСИКАЦІЄЮ НА КЛЮЧОВІ ФАКТОРИ ТРАНСПОРТНИХ СИСТЕМ КРОВІ

Ключові слова: алкоголізм, IgG, альбумін, інсулін, тромбоцити, інгібітор активаторів плазміногена 1 типу.

Резюме. *Методом афінної хроматографії виділено фракцію імуноглобулінів класу IgG із сироватки крові щурів із хронічною алкогольною інтоксикацією. Показано, що за вживання етанолу в організмі формується значна кількість автоантитіл до альбуміну та інсуліну. Виявлено підвищений титр антитіл до бактеріально-го білка стрептокінази, що може свідчити про підвищення чутливості до бактеріальних інфекцій за умов даної патології. Встановлено порушення секреторної функції тромбоцитів.*

Вступ

В останні роки проблема впливу малих і надмалих доз антитіл до ряду ендogenous субстанцій (структурні білки, опіоїди, пептиди) привертає увагу як дослідників фундаментальної науки, так і клініцистів. Існує думка, що малі та надмалі дози антитіл можуть виступати індукторами біологічних процесів і регуляторами адаптацій. Малі та надмалі дози афінно очищених антитіл можуть запускати і запускають в даний час ще недостатньо вивчені механізми неспецифічної опірності організму, що проявляється підвищенням імунітету, емоційно регулюючою дією, здатністю знижувати тягу до спиртного і наркотичних засобів [3, 1].

У даній роботі увагу зосереджено на компонентах транспортних систем крові. Основним представником цих систем вважається сироватковий альбумін, оскільки його вміст становить 60% усього білкового пулу плазми. Альбумін відповідає за транспорт ендogenous та екзогенних субстанцій, що зумовлено структурними особливостями його молекули: наявністю множинних сайтів зв'язування та здатністю до конформаційних перебудов. Можливості альбуміну як транспортного засобу для медикаментів широко висвітлені в науковій літературі та продовжують досліджуватися. Проте про його взаємодію з ендogenous субстанціями відомо значно менше [14]. До ключових компонентів транспортних систем крові слід також віднести інсулін, який може вступати у взаємодію з ендogenous факторами. Відомо, що аналоги інсуліну здатні формувати нековалентні комплекси з білками плазми крові, змінюючи направленість біохімічних процесів системи гемостазу [5]. Серед інших специфічних

транспортних систем крові необхідно також виділити тромбоцити, які є джерелом багатьох біологічно-активних молекул, у тому числі інгібітора активаторів плазміногена 1 типу (PAI-1). Відомо, що висока локальна концентрація тромбоцитарного PAI-1, яка є наслідком фізіологічної та патологічної активації тромбоцитів є вагомим фактором тромбогенезу [15].

Мета дослідження

З'ясувати вплив IgG, утворених в організмі під впливом етанолу, на аспекти функціонування транспортних систем крові.

Матеріал і методи

Гостру хронічну алкогольну інтоксикацію викликали внутрішньошлунковим введенням 30% етанолу. Етанол вводили з розрахунку 2 мл на 100 г маси тіла тварини протягом 21 доби, один раз на добу.

IgG виділяли з сироватки крові методом афінної хроматографії на протеїн А сефарозі. Фракцію антитіл елюювали 100 мМ гліцин-HCl, рН 2,2 [12]. Фракцію додатково очищували для позбавлення від важких та легких ланцюгів імуноглобулінів на Sephadex G75. Хроматографічне розділення проводили у 50 мМ Na-фосфатному буфері рН 7,4 зі швидкістю 1 мл/хв.

Чистоту препарату IgG контролювали методом диск-електрофорезу за Лемлі [16]. Для відновлення дисульфідних зв'язків застосовували 5% β-меркаптоетанол. Гелі фарбували 0,125% розчином кумасі G-250 у 25% ізопропанолі та 10% оцтової кислоті.

Біотинілювання виділених IgG здійснювали згідно методики [8].

Наявність у фракціях імуноглобулінів класу IgG автоантитіл до щурячого сироваткового альбуміну та інсуліну (в якості антигену використовувався рекомбінантний інсулін людини) визначали методом імуноферментного аналізу [11]. Для проведення аналізу фракції використовували у концентрації 0,5 мкг/мл.

Секрецію PAI-1 тромбоцитами досліджували методом вестерн-блотингу [10]. Тромбоцити інкубували зі стрептокіназою протягом 1 години та осаджували клітини центрифугуванням за 300 g протягом 15 хв. і температурі 20 С. Середовище інкубації тромбоцитів використовували як зразки для проведення аналізу.

Обговорення результатів дослідження

Для проведення досліджень методом афінної хроматографії на протеїн А сефарозі з сироватки крові контрольних щурів (IgGк) та щурів із хронічною алкогольною інтоксикацією (IgGa) отримували фракції імуноглобулінів класу IgG. Кров для хроматографічного аналізу відбирали на 21 день введення тваринам етанолу.

Імуноферментний аналіз наявності у фракції IgG щурів із хронічною алкогольною інтоксикацією аутоантитіл до щурячого сироваткового альбуміну показав, що фракція проявляє спорідненість до цього білку, причому у 26 разів вищу, ніж характерна для фракції антитіл контрольних щурів. Також спостерігалось підвищення титру автоантитіл до інсуліну у фракції IgGa, що перевищував контрольний показник практично в 9 разів.

Необхідно відмітити, що вживання етанолу також спричинило деяке збільшення титру антитіл до стрептокінази, порівняно з контрольною групою тварин. Стрептокіназа – це білок бактеріального походження, який продукується різними видами (С, G, А серологічні групи) бета-гемолітичних стрептококів. Вважається, що вона бере участь в інвазії стрептококами організму господаря [4]. Спорідненість IgGa до препарату в 1,6 раза перевищувала даний показник для IgGк. Отримані нами дані можуть свідчити про більшу схильність алкоголіків до захворюваності на бактеріальні інфекції і, відповідно, про пригнічення функції імунітету.

Для оцінки функції тромбоцитів під впливом імуноглобулінів класу IgG ми провели дослідження тромбоцитарного пулу інгібітора активаторів плазміногена 1 типу (PAI-1). Дані літератури дозволяють розглядати цей глікопротеїн як маркер функціонування тромбоцитів. Окрім того, ряд досліджень свідчить про те, що високий рівень саме тромбоцитарного PAI-1 сприяє розвитку тромбозів [9, 13, 15].

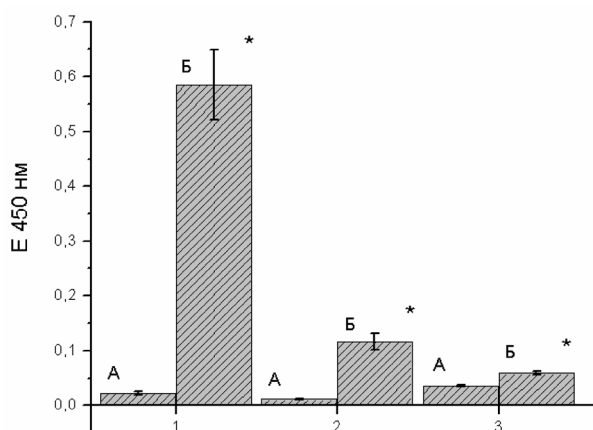


Рис. 1. Спорідненість IgG сироватки крові контрольних щурів (А) та щурів з хронічною алкогольною інтоксикацією (Б) до: 1 – альбуміну; 2 – інсуліну; 3 – стрептокінази; * – $P < 0.05$ відносно контролю

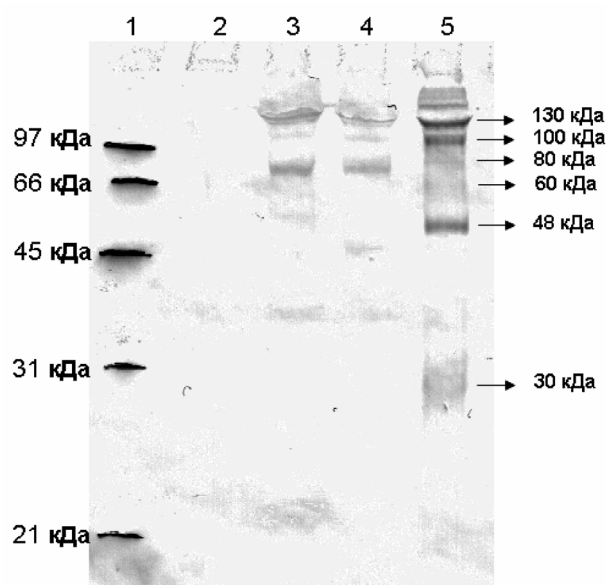


Рис. 2. Блотограма аналізу вмісту PAI-1 у середовищі інкубації тромбоцитів (2) та під впливом IgG щурів із хронічною алкогольною інтоксикацією (3), IgG контрольних щурів (4), IgG хворих на системний червоний вовчак (5). Для визначення молекулярної маси використовували суміш маркерних білків (1)

Для проведення аналізу отримували фракцію чистих тромбоцитів контрольних щурів та інкубували клітини протягом 30 хв за 37°C з фракціями IgGк (рис. 2., трек 4) та IgGa (рис. 2., трек 3). Трек 2 відображає результат інкубації тромбоцитів за аналогічних умов у буфері для виділення без внесення додаткових агентів. Для проведення аналізу використовували антитіла у кінцевій концентрації 1 мг/мл.

У зразку, який містив IgG контрольних щурів, чітко простежується наявність 3-х комплексних

форм інгібітора з молекулярними масами в районі 130, 100 та 80 кДа. Також спостерігається незначне фрагментування.

При внесенні до зразка IgG шурів із хронічною алкогольною інтоксикацією виявлено збільшення секреції комплексів із молекулярними масами 130 та 80 кДа у 2,5 рази та 1,24 рази відповідно. Також зросла фрагментація PAI-1. Загальний пул інгібітору, який вивільнився з тромбоцитів, перевищив вміст PAI-1 у зразку з IgG контрольних шурів у 1,7 рази.

Як ще для одного контролю було використано фракцію імуноглобулінів класу IgG хворих на системний червоний вовчак (IgGCЧВ). Патологія характеризується лавиноподібною аутоімунною відповіддю на антигени власного організму. Тромбози є одним з основних ускладнень за цієї хвороби [6, 7]. Тому порівняння секреторної функції тромбоцитів під впливом IgGCЧВ та IgGa може надати суттєву інформацію про величину протромботичного ефекту обох патологічних станів. Трек 5 рис. 2 відображає результат впливу IgGCЧВ на секрецію PAI-1 з тромбоцитів. З рисунку видно, що фракція IgG хворих на системний червоний вовчак має найбільш негативний вплив на тромбоцити. У результаті активації клітин у середовище інкубації секретується значна кількість інгібітору. Загальний пул PAI-1 перевищує показник, характерний для антитіл контрольних тварин майже в 4 рази. На блотограмі видно появу трьох комплексних форм інгібітору з молекулярними масами 130, 100 та 80 кДа, характерних також для впливу IgGa. Смуга в районі 60 кДа може містити вільну форму інгібітора. Також простежується поява ще трьох високомолекулярних комплексів, визначити молекулярну масу яких не вдалося через високу щільність гелю. Значно посилюється фрагментування інгібітору в районі 48 та 30 кДа.

Висновки

1. Хронічна алкогольна інтоксикація супроводжується утворенням аутоантитіл до альбуміну та інсуліну, що свідчить про порушення функціонування транспортних систем крові.

2. Хронічна алкогольна інтоксикація призводить до зростання титру антитіл до стрептокінази, що може вказувати на підвищення чутливості до бактеріальних інфекцій за умов даної патології.

3. IgG, утворені в організмі за вживання етанолу, спричиняють порушення секреторної функції тромбоцитів, проте ефект є менш вираженим, ніж за умов впливу IgG хворих на системний червоний вовчак.

Перспективи подальших досліджень

У ході подальшої роботи планується провести кількісне хроматографічне визначення аутоантитіл до альбуміну та інсуліну в плазмі крові за хронічної алкогольної інтоксикації та визначення маркерних аутоантитіл для розвитку даного патологічного стану.

Література. 1. Давыдов А. Т. Пропротен-100 в лечении постабстинентных расстройств у больных с алкогольной зависимостью / А. Т. Давыдов, И. Б. Базиленко, П. Д. Шабанов // Психофармакология и биологическая наркология. – 2004. – № 2-3 (4). – С. 656–661. 2. Штарк М. Б. Сверхмалые дозы антител к нейроспецифическим веществам — новый класс психотропных препаратов / М. Б. Штарк, О. И. Эпштейн, Е. В. Комаров // Сб. статей. М.: МГУС. – 2002. – С. 124–127. 3. Ben N.A. Streptokinase activates plasminogen bound to human group C and G streptococci through M-like proteins / N.A. Ben, A. Wistedt, U. Ringdahl et al. // Eur. J Biochem. – 1994. – Vol.222. – P. 267 – 276. 4. Shojae-Moradie F. Effect of thyroid hormone binding proteins on insulin receptor binding of B1-thyronine-insulin analogues / F. Shojae-Moradie, P.Y. Michelle Chan, Micaela A. Telfer et al. // Biochem J. – 2004. – 381(Pt 1). – P. 51–57. 5. Galli M. Lupus anticoagulants are stronger risk factors for thrombosis than anticardiolipin antibodies in the antiphospholipid syndrome: a systematic review of the literature / M. Galli, D. Luciani, G. Bertolini et al. // Blood. – 2003. – 101. – P. 1827–1832. 6. Gastineau D.A. Lupus anticoagulant: An analysis of the clinical and laboratory features of 219 cases / D.A. Gastineau, F.J. Kazmier, W.L. Nichols et al. // Am. J. Hematol. – 1985. – 19, № 3. – P. 265–275. 7. Gilting G. Studies on the biotin-binding site of avidin / G. Gilting, E. Bayer, M. Wilchek // Biochem. J. – 1987. – 242. – P. 923–926. 8. Hamsten A. Plasminogen activators inhibitor in plasma: risk factor for recurrent myocardial infarction / A. Hamsten, U. De Faire, G. Walldius et al. // Lancet. – 1987. – Vol. 2. – P. 3–9. 9. Harlow E. Antibodies / E. Harlow, D. Lane. – New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 1988. – 726 p. 10. Hockfield S. Selected methods for antibody and nucleic acid probes / S. Hockfield, S. Carlson, C. Evans. – USA: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1993. – 680 p. 11. Huse K. Purification of antibodies by affinity chromatography / K. Huse, H.J. Buhme, G.H. Scholz // J Biochem Biophys Methods. – 2002. – 51, № 3. – P. 217–31. 12. Jansson J. Von Willebrand factor in plasma: a novel risk factor for recurrent myocardial infarction and death / J. Jansson, T. Nilsson, O. Johnsson // Brit. Heart. J. – 1991. – Vol. 66. – P. 351 – 355. 13. Jupin M. NMR identification of endogenous metabolites interacting with fatted and non-fatted human serum albumin in blood plasma: Fatty acids influence the HSA-metabolite interaction // M. Jupin, P.J. Michiels, F.C. Girard et al. // J Magn Reson. – 2013, 8;228. – P. 81–94. [Epub ahead of print] 14. Soeki T. Plasma and Platelet Plasminogen Activator Inhibitor-1 in Patients With Acute Myocardial Infarction / T. Soeki, T. Yoshiyuki, N. Fucuda et al. // Jpn. Circ.J. – 2000. – Vol 64. – P. 547 – 553. 15. Weber K. The reliability of molecular weight determinations by dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis / K. Weber, M. Osborn // J. Biol.Chem. – 1969. – Vol. 244, № 16. – P. 4406 – 4412.

ВЛИЯНИЕ ФРАКЦИИ IGG КРЫС С ХРОНИЧЕСКОЙ АЛКОГОЛЬНОЙ ИНТОКСИКАЦИЕЙ НА КЛЮЧЕВЫЕ ФАКТОРЫ ТРАНСПОРТНЫХ СИСТЕМ КРОВИ

*Н. К. Кравченко, А. Н. Савчук,
Л. И. Остапенко, И. О. Степанец*

Резюме. Методом аффинной хроматографии выделено фракцию иммуноглобулинов класса IgG из сыворотки крови крыс с хронической алкогольной интоксикацией. Показано, что при употреблении этанола в организме формируется значительное количество аутоантител к альбумину и инсулину. Обнаружено повышение титра антител к бактериальному белку стрептокиназе, что может свидетельствовать о повышенной чувствительности к бактериальным инфекциям при

данной патологии. Установлено нарушение секреторной функции тромбоцитов.

Ключевые слова: алкоголизм, IgG, альбумин, инсулин, тромбоциты, ингибитор активаторов плазминогена 1 типа.

THE IMPACT OF IGG FRACTIONS IN RATS WITH CHRONIC ALCOHOL INTOXICATION ON KEY FACTORS OF THE BLOOD TRANSPORT SYSTEM

*N.K.Kravchenko, A.N.Savchuk,
L.I.Ostapchenko, I.O.Stepanets*

Purpose. To determine the impact of IgG, formed in the body under the influence of ethanol, on the aspects of transport systems functioning.

Materials and methods. By affinity chromatography on protein A sepharose we have purified IgG fraction from serum of rats with chronic alcohol intoxication. To determine the presence of autoantibodies to albumin and insulin in the purified fraction ELISA was used. To assess platelet reactivity under the influence of IgG fraction western blot for plasminogen activator inhibitor type 1 was performed.

Results. Under chronic alcohol intoxication antialbumin antibodies titer exceeded norm by 26 times, whereas antiinsulin antibodies titer exceeded the control level by 9 times. The increment of antistreptokinase antibodies titer might support that alcoholics are

more susceptible to bacterial infections. Platelet reactivity under the influence of IgG fractions was assessed via plasminogen activator inhibitor type 1 (PAI-1) exocytosis. We have compared the effect of two different IgG fractions: purified from serum of rats with chronic alcohol intoxication and of patients with systemic lupus erythematosus. It was shown that PAI-1 content in the platelet incubation medium with IgG formed under alcohol influence was elevated by 1, 7 times compared with the control, whereas IgG of patients with systemic lupus erythematosus caused the increment of PAI-1 secretion by 4 times.

Conclusion. Chronic alcohol intoxication caused the formation of autoantibodies to albumin and insulin, as well as increment of antistreptokinase antibodies titer. IgG of patients with systemic lupus erythematosus caused the most significant platelet activation, whereas IgG formed under alcohol influence showed weaker result.

Key words: alcoholism, IgG, albumin, insulin, platelets, plasminogen activator inhibitor type 1.

Taras Shevchenko National University (Kyiv)

Clin. and experim. pathol.- 2013.- Vol.12, №1 (43).-P.97-100.

Надійшла до редакції 07.02.2013

Рецензент – доц. Г.Д.Коваль

*© Н. К. Кравченко, О. М. Савчук, Л. І. Остапченко,
І. О. Степанець, 2013*