

УДК 57.084.1, 57.088.1

**ЗМІНА СПІВВІДНОШЕННЯ БІЛКОВИХ ФРАКЦІЙ СИРОВАТКИ КРОВІ
У ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНИХ ТВАРИН РІЗНОГО ВІКУ ПІСЛЯ ІМУНІЗАЦІЇ
ЦИТОТОКСИЧНОЮ СИРОВАТКОЮ ХВОРИХ З АУТОІМУННИМ
ЗАХВОРЮВАННЯМ – МІАСТЕНІЄЮ**

О. Клімова*, О. Звягінцева, А. Малишев*****

**Державна установа «Інститут загальної та невідкладної хірургії»
академії медичних наук України
в'їзд Балакірева, 1, Харків 61018, Україна*

***Національний технічний університет «Харківський політехнічний інститут»
вул. Фрунзе, 21, Харків 61002, Україна*

****Науково-дослідний інститут біології Харківського національного
університету імені В.Н. Каразіна
пл. Незалежності, 4, Харків 61077, Україна*

Проведено дослідження співвідношення білкових фракцій у сироватці крові тварин різного віку, яких імунізували сироваткою хворих з аутоімунним захворюванням – міастенією. Для вивчення змін у співвідношенні білкових фракцій використали два методи електрофорезу: на плівках із ацетату целюлози та в поліакриламідному гелі. Виявлено деякі відмінності у співвідношенні білкових фракцій сироватки крові імунізованих тварин порівняно з показниками контрольної групи (інтактні тварини) і тварин різних вікових груп. Показано, що реакція дорослих і молодих тварин на багатократну імунізацію відрізняється у наборі й інтенсивності синтезу різних типів білків.

Ключові слова: імунізація тварин, електрофорез на плівках із ацетату целюлози, електрофорез у поліакриламідному гелі, білкові фракції.

Відомо, що при імунізації паралельно зі специфічними імуноглобуліновими анти-тілами та зміною цитокинового профілю можуть утворюватися стресорні білки – шаперони, адаптерні білки. Характер утворення стресорних білків може залежати не тільки від властивостей імунізуючого чинника, а й від загальної резистентності та віку імунізованого організму [7].

До нормальних функціональних білків, що містяться в сироватці крові, належать альбумінові та глобулінові білки. Альбуміни – це гомогенна фракція з молекулярною масою (ММ) 60–70 кДа. Вони добре утримують воду, на їхню частку припадає до 80% колоїдно-осмотичного тиску крові. Сироваткові глобуліни представляють групу білків із меншим ступенем дисперсності й із неоднаковою молекулярною масою, так ММ α_1 - і α_2 - і β -глобулінів коливається в межах від 100 до 450 кДа, а ММ γ -глобулінової фракції – до 900 кДа. Збільшення вмісту α -глобулінів у крові спостерігається при запальних процесах, стресах. У фракції β -глобулінів присутні ліпопротеїди, тому їхня кількість збільшується при гіперліпопротеїдеміях. Підвищення вмісту γ -глобулінів спостерігається при посиленні імунних процесів. Зменшення γ -глобулінів відзначається при станах, пов'язаних із виснаженням, пригніченням імунної системи [6].

Стресорні білки мають відносно невелику ММ (8,5–110 кДа). Вони є консервативними

і відіграють ключову роль у функціонуванні біологічних систем усіх рівнів організації. Накопичуючись при різних шкідливих впливах, вони підтримують клітинний гомеостаз [2]. Стресорні білки не тільки реагують на зовнішні стресові ситуації, але також можуть утворюватися при метаболічних змінах в організмі, канцерогенезі, викликаючи активізацію імунної системи. Індукторами синтезу стресорних білків можуть виступати різноманітні фактори: підвищена температура, зараження вірусами й мікроорганізмами, цитокіни, цитотоксичні фактори, чужорідні білки та ін. [5].

При багатьох захворюваннях у сироватці крові може змінюватися співвідношення білкових фракцій, хоча загальний вміст білка може залишатися нормальним. Становить певний практичний і теоретичний інтерес дослідження ймовірних змін співвідношення білкових фракцій у експериментальних тварин після введення в їхній організм різних цитотоксичних сироваток.

За допомогою електрофорезу можна ідентифікувати співвідношення функціональних білків за їхньою молекулярною масою та зарядом. Наявність різних білкових фракцій, що мають різну електрофоретичну рухливість, може бути маркером різних компенсаторно-адаптивних реакцій і патологічних процесів, які стосуються механізмів метаболізму на системному та клітинному рівні. Таким чином, метою даної роботи було вивчення змін у білкових фракціях сироватки крові молодих і дорослих експериментальних тварин на багатократно імунізацію цитотоксичною міастогенною сироваткою крові.

Усі експериментальні маніпуляції з лабораторними тваринами проводили відповідно до норм Європейської конвенції з біоетики [4].

Дослідження проводили на 8 півторамісячних та 8 шестимісячних щурах-самцях лінії Вістар. Експериментальних тварин імунізували сироваткою крові хворих людей, яка містила цитотоксичні міастогенні компоненти, що викликають порушення синоптичної передачі. Під час експерименту лабораторних тварин розділили на 4 групи. Перша та друга групи – тварини у віці 1,5 і 6 місяців відповідно, їх не імунізували (контрольні групи). Тваринам даних груп вводили фізіологічний розчин у тому ж об'ємі, що й цитотоксичну сироватку. Третя й четверта групи – молоді (1,5-місячні) та дорослі (6-місячні) щури відповідно, яких імунізували сироваткою крові хворих з міастенією.

Трикратну імунізацію лабораторних тварин проводили шляхом внутрішньочеревинного введення 0,4 мл сироватки, що містила цитотоксичні міастогенні фактори. Вторинну і третинну імунізацію проводили через 7 днів після попередньої імунізації. Через 7 днів після останньої імунізації піддослідних тварин виводили з експерименту методом декапітації та здійснювали забір крові для дослідження білкових фракцій.

Для вивчення зміни співвідношення білкових фракцій застосовували два різні методи електрофорезу. Метод електрофорезу на плівках із ацетату целюлози [1] з подальшою денситометрією результатів. І метод електрофорезу у градієнтному (градієнт 7–10%) поліакриламідному гелі (ПААГ) [3]. Верифікацію білкових фракцій здійснювали в автоматичному режимі за допомогою програми Gel eye. Результати вважали достовірними при $P \leq 0,05$.

Експеримент передбачав оцінку співвідношення білкових фракцій сироватки крові імунізованих, яка містила цитотоксичні фактори різної природи та володіла потенційною імуногенністю, що стимулює неспецифічні реакції й утворення стресорних низькомолекулярних білків.

Проведені дослідження показали, що після багатократно імунізації у тварин порівняно з інтактними виявлено деякі зміни електрофоретичної рухливості білкових фракцій в обох вікових групах.

За допомогою електрофорезу на плівках із ацетату целюлози сироваткові білки розділялися на 5 фракцій: альбумінову й 4 глобулінових групи (α_1 -, α_2 -, β -, γ -глобуліни).

Електрофоретичне розділення білкових фракцій сироватки крові експериментальних тварин методом електрофорезу на плівках із ацетату целюлози наведено на рис. 1.

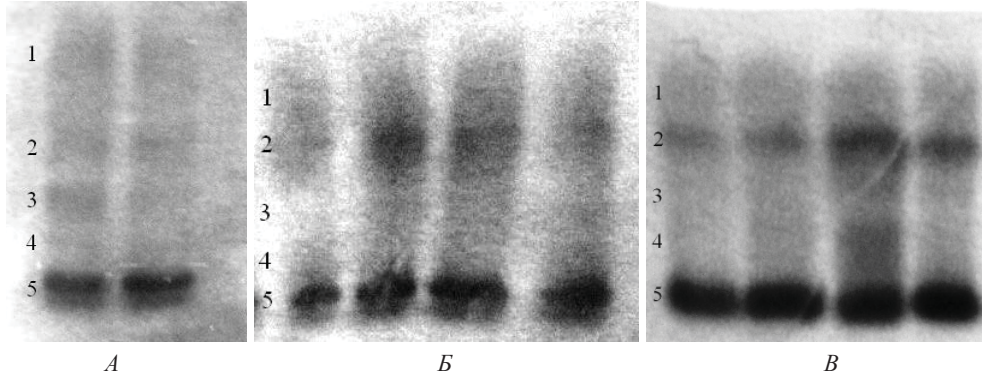


Рис. 1. Електрофореграма білків сироватки крові на плівках із ацетату целюлози: білкові фракції контрольних тварин (А); дорослих (Б) і молодих (Б) експериментальних тварин після імунізації цитотоксичною міастогенною сироваткою; 1) γ -глобуліни, 2) β -глобуліни, 3) α_2 -глобуліни, 4) α_1 -глобуліни, 5) альбуміни.

Результати денситометричної оцінки співвідношення білкових фракцій досліджуваних сироваток крові молодих і дорослих експериментальних тварин методом електрофорезу на ацетат-целюлозних плівках представлено в табл. 1 і 2 відповідно.

Таблиця 1

Співвідношення білкових фракцій сироватки крові молодих експериментальних тварин методом електрофорезу на ацетат-целюлозних плівках (%; $M \pm m$; $n=4$)

Група експериментальних тварин	Білкові фракції				
	Альбумін	α_1 -глобулін	α_2 -глобулін	β -глобулін	γ -глобулін
Контроль (інтактні тварини)	27,58 \pm 5,2	13,6 \pm 2,4	15,15 \pm 2,2	26,98 \pm 1,37	16,75 \pm 5,78
Дослід (тварини, імунізовані сироваткою хворих з міастенією)	22,48 \pm 1,08	11,83 \pm 1,47	18,98 \pm 1,7	26,83 \pm 1,71	19,93 \pm 1,74

Таблиця 2

Співвідношення білкових фракцій сироватки крові дорослих експериментальних тварин методом електрофорезу на ацетат-целюлозних плівках (%; $M \pm m$; $n=4$)

Група експериментальних тварин	Білкові фракції				
	Альбумін	α_1 -глобулін	α_2 -глобулін	β -глобулін	γ -глобулін
Контроль (інтактні тварини)	57,2 \pm 3,69	6,04 \pm 0,99	9,8 \pm 1,81	14,7 \pm 7,31	8,46 \pm 2,24
Дослід (тварини, імунізовані сироваткою хворих з міастенією)	47,82 \pm 1,57*	6,51 \pm 0,29	9,92 \pm 0,49	15,43 \pm 0,66	16,35 \pm 0,29*

Примітка. * різниця достовірна порівняно з показниками у контролі, $P \leq 0,05$.

Електрофорезом на ацетат-целюлозних плівках білків сироватки крові тварин після їхньої трикратної імунізації виявлено певні зміни в білкових фракціях. У групі молодих тварин після імунізації сироваткою крові, що містила цитотоксичні міастогенні фактори, спостерігалася тенденція до зниження альбумінової, α_1 -глобулінової фракцій та незначне збільшення α_2 - і γ -глобулінових фракцій порівняно з контрольною групою (табл. 1).

У дорослих тварин після трикратної імунізації сироваткою крові, що містила цитотоксичні міастогенні фактори, була інша спрямованість змін у перерозподілі білкових фракцій на електрофореграмах. Знизився вміст альбумінової фракції на 16,4% порівняно з контрольною групою. Фракція γ -глобулінів збільшилася у 2 рази порівняно з контрольною групою. β -, α_1 - і α_2 -глобулінові фракції достовірно не змінилися (табл. 2).

Таким чином, реакція молодих і дорослих тварин на багатократну імунізацію дещо відрізняється в інтенсивності синтезу білків сироватки крові та в їхньому кількісному співвідношенні.

Електрофоретичне розділення білкових фракцій сироватки крові експериментальних тварин методом електрофорезу в ПААГ наведено на рис. 2 і 3.

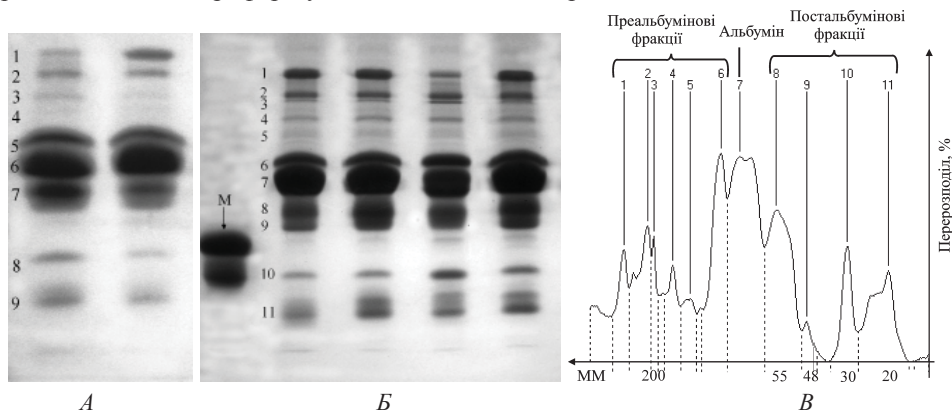


Рис. 2. Електрофореграма білків сироватки крові в ПААГ молодих тварин контрольної групи (А): 1) γ -глобуліни, 2) β -глобуліни, 3) α_2 -глобуліни, 4) α_1 -глобуліни, 5) препальбумінова фракція, 6) альбуміни, 7) ~ 55 кДа, 8) ~ 30 кДа, 9) ~ 20 кДа; молодих експериментальних тварин після імунізації міастогенною сироваткою (Б): 1) γ -глобуліни, 2) β -глобуліни, 3) ~ 200 кДа, 4) α_2 -глобуліни, 5) α_1 -глобуліни, 6) препальбумінова фракція, 7) альбуміни, 8) ~ 55 кДа, 9) ~ 48 кДа, 10) ~ 30 кДа, 11) ~ 20 кДа; М – маркер із ММ 45 кДа; відсотковий розподіл білкових фракцій, імунізованих міастогенною сироваткою тварин в автоматичному режимі (В).

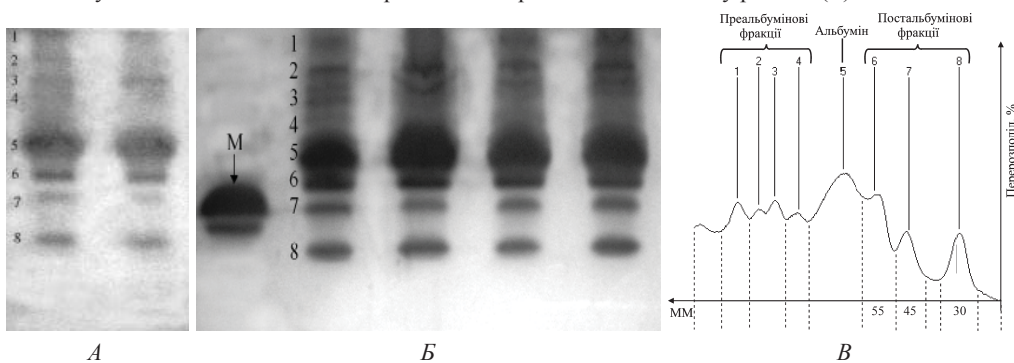


Рис. 3. Електрофореграма білків сироватки крові в ПААГ дорослих тварин контрольної групи (А): 1) γ -глобуліни, 2) β -глобуліни, 3) α_2 -глобуліни, 4) α_1 -глобуліни, 5) альбуміни, 6) ~ 55 кДа, 7) ~ 45 кДа, 8) ~ 30 кДа; дорослих експериментальних тварин після імунізації міастогенною сироваткою (Б): 1) γ -глобуліни, 2) β -глобуліни, 3) α_2 -глобуліни, 4) α_1 -глобуліни, 5) альбуміни, 6) ~ 55 кДа, 7) ~ 45 кДа, 8) ~ 30 кДа; М – маркер із ММ 45 кДа; відсотковий розподіл білкових фракцій імунізованих міастогенною сироваткою тварин в автоматичному режимі (В).

Верифікація співвідношення білкових фракцій у досліджуваних сироватках крові молодих і дорослих експериментальних тварин методом електрофорезу в ПААГ представлено в табл. 3 і 4.

Таблиця 3

Співвідношення білкових фракцій сироватки крові молодих експериментальних тварин методом електрофорезу в ПААГ (%; M±m; n=4)

Білкові фракції	Співвідношення білкових фракцій у сироватці крові молодих інтактних тварин	Співвідношення білкових фракцій у сироватці крові молодих тварин, імунізованих міастогенною сироваткою
γ-глобуліни	6,05±1,24	10,03±1,00*
β-глобуліни	5,2±1,96	6,66±1,79
фракція 200 кДа	–	1,78±0,39*
α ₂ -глобуліни	4,05±0,93	3,47±1,07
α ₁ -глобуліни	0,71±0,67	3,18±1,25*
преальбумінова фракція	19,94±2,65	12,17±2,63
альбуміни	36,08±5,18	24,63±7,80
постальбумінова фракція 1 (~55 кДа)	25,04±7,17	14,97±5,88
постальбумінова фракція 2 (~48кДа)	–	9,80±0,32*
постальбумінова фракція 3 (~30кДа)	2,04±0,58	4,51±0,76*
постальбумінова фракція 4 (~20кДа)	4,88±0,90	8,8±1,31*

Примітка. * різниця достовірна порівняно з показниками у контролі, P<0,05.

У результаті електрофорезу в ПААГ білки сироватки крові молодих тварин розділялися до 11 фракцій (рис. 2). При цьому виявлені істотні відмінності у співвідношенні білкових фракцій сироватки крові в інтактних молодих тварин контрольної групи та молодих тварин після імунізації цитотоксичною міастогенною сироваткою. Після імунізації в сироватці крові тварин спостерігається тенденція до зниження постальбумінової фракції 1 порівняно з контрольною групою. У групі молодих імунізованих тварин виявлено додаткову постальбумінову фракцію 2, яка не визначалася в сироватці нативних тварин. У постальбумінових фракціях 3 і 4 імунізованих тварин кількість білка удвічі перевищувала контрольні значення. У імунізованих тварин сумарно збільшуються глобулінові фракції, максимальне збільшення спостерігали γ-фракції, яка збільшується в 1,5 рази порівняно з контрольною групою. В імунізованих молодих тварин виявлена наявність преальбумінової фракції з молекулярною масою 200 кДа, якої немає в сироватці інтактних тварин.

Таблиця 4

Співвідношення білкових фракцій сироватки крові дорослих експериментальних тварин методом електрофорезу в ПААГ (%; M±m; n=4)

Білкові фракції	Співвідношення білкових фракцій у сироватці крові дорослих інтактних тварин	Співвідношення білкових фракцій у сироватці крові дорослих тварин, імунізованих міастогенною сироваткою
γ-глобуліни	9,66±1,14	12,40±1,55*
β-глобуліни	7,97±0,88	9,08±0,81
α ₂ -глобуліни	4,33±1,16	5,59±0,89
α ₁ -глобуліни	5,85±0,65	7,33±2,33
альбуміни	46,14±5,79	33,14±7,01
постальбумінова фракція 1 (~55кДа)	19,15±2,84	17,21±3,93
постальбумінова фракція 2 (~45 кДа)	5,51±1,26	8,80±1,79*
постальбумінова фракція 3 (~30кДа)	1,39±0,40	6,45±3,04*

Примітка. * різниця достовірна порівняно з показниками у контролі, P<0,05.

Результати досліджень показали, що у дорослих експериментальних тварин після імунізації змінюється співвідношення білкових фракцій: дещо знизилася альбумінова фракція, достовірно збільшилися постальбумінова фракція 2 в 1,6 разу і постальбумінова фракція 3 у 5 разів порівняно з контрольною групою. У дорослих імунізованих тварин, як і у молодих імунізованих тварин, сумарно збільшуються глобулінові фракції, максимальне збільшення спостерігали γ -фракції, яка зростає на 28,4% порівняно з контрольною групою (рис. 3).

Електрофорез у ПААГ білків сироватки крові імунізованих тварин виявив додаткові фракції низькомолекулярних білків. У дорослих тварин виявлені білкові фракції із ММ 45 кДа. У молодих тварин, на відміну від дорослих, були тільки сліди цієї фракції, але в них достовірно збільшилися дві низькомолекулярні фракції із ММ 30 і 20 кДа порівняно з контрольною групою. Таким чином, виявлено вікові відмінності у кількісному співвідношенні й інтенсивності синтезу різних типів низькомолекулярних білків.

У тварин різних вікових груп після імунізації цитотоксичною міастогенною сироваткою виявили зміни у кількісному співвідношенні білкових фракцій порівняно з тваринами контрольної групи.

Після імунізації у дорослих тварин збільшуються постальбумінові фракції з молекулярною масою ~ 45 і ~ 30 кДа, а у молодих тварин – з молекулярною масою ~ 30 і ~ 20 кДа, що може бути зумовлене різними адаптаційними резервами старих і молодих тварин.

1. Камышников В. С. Справочник по клинико-биохимическим исследованиям и лабораторной диагностике. М.: МЕДпресс-информ, 2004. 920 с.
2. Маргулис Б. А., Гужова И. В. Белки стресса в эукариотической клетке // Цитология. 2000. Т. 42. С. 323–342.
3. Остерман Л. А. Методы исследования белков и нуклеиновых кислот: Электрофорез и ультрацентрифугирование: Практ. пособ. М.: Наука, 1981. 288 с.
4. Розвиток ідей біоетики у європейському контексті: Матер. IV Міжнар. симпозіуму з біоетики / упор. С.В. Пустовіт, В.Л. Кулініченко, О.Г. Карагодіна. К.: СФЕРА, 2006. 160 с.
5. Hartl F. U. Molecular chaperones in cellular protein folding // Nat. 1996. Vol. 381. P. 571–579.
6. Maes M., Wauters A., Neels H. et al. Total serum protein and protein fractions in depression: relationships to depressive symptoms and glucocorticoid activity // J. Affective Disorders. 1995. Vol. 34. N. 1. P. 61–69.
7. Stuart K. Calderwood, Ayesha Murshid, Thomas Prince. The shock of aging: molecular chaperones and the heat shock response in longevity and aging – a mini-review // Gerontol. 2009. Vol. 55. N. 5. P. 550–558.

Стаття: надійшла до редакції 21.09.10

доопрацьована 03.11.10

прийнята до друку 15.11.10

CHANGE OF BLOOD SERUM PROTEIN FRACTION RATIO AT EXPERIMENTAL ANIMALS OF DIFFERENT AGE AFTER IMMUNIZATION BY CYTOTOXIC SERUM OF PATIENT WITH AUTOIMMUNE DISEASE – MYASTHENIA

E. Klimova*, O. Zvyagintseva, A. Malyshev*****

**PI «Institute of General and Urgent Surgery» of Ukraine Medical Sciences Academy
1, Balakirev entry, Kharkiv 61018, Ukraine*

***National Technical University «Kharkiv Polytechnical Institute»
21, Frunze St., Kharkiv 61002, Ukraine*

****Research Institute of Biology, V.N. Karazin Kharkiv National University
4, Svobody Sq., Kharkiv 61077, Ukraine*

The research of protein fractions ratio in blood serum of different age animals which have been immunized by serum of patient with autoimmune diseases – myasthenia is carried out. Two methods of electrophoresis: on acetate-cellulose films and electrophoresis in polyacrylamide gel are used for study differences at protein fraction percentage ratio. Some differences at protein fraction percentage ratio in blood serum of immunized animals in comparison with control group values of intact animals and animals of different age groups. It is shown that reaction of grown-up and young animals to repeated immunization differs in composition and synthesis activity of protein different types.

Key words: animal immunization, electrophoresis on acetate-cellulose films, electrophoresis in polyacrylamide gel, protein fractions.

ИЗМЕНЕНИЕ СООТНОШЕНИЯ БЕЛКОВЫХ ФРАКЦИЙ СЫВОРОТКИ КРОВИ У ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ ЖИВОТНЫХ РАЗНОГО ВОЗРАСТА ПОСЛЕ ИММУНИЗАЦИИ ЦИТОТОКСИЧЕСКОЙ СЫВОРОТКОЙ БОЛЬНЫХ С АУТОИММУННЫМ ЗАБОЛЕВАНИЕМ – МИАСТЕНИЕЙ

Е. Климова*, О. Звягинцева, А. Малышев*****

**ГУ «Институт общей и неотложной хирургии» АМН Украины
въезд Балакирева, 1, Харьков 61018, Украина*

***Национальный технический университет
«Харьковский политехнический институт»
ул Фрунзе, 21, Харьков 61002, Украина*

****Научно-исследовательский институт биологии Харьковского
национального университета имени В. Н. Каразина
пл. Свободы, 4, Харьков 61077, Украина*

Проведено исследование соотношения белковых фракций в сыворотке крови животных, иммунизированных сывороткой больных с аутоиммунным заболеванием – миастенией. Для изучения изменений в соотношении белковых фракций использовали два метода электрофореза: на пленках из ацетата целлюлозы и в полиакриламидном геле. Выявлены некоторые отличия в соотношении белковых фракций сыворотки крови иммунизированных животных по сравнению с показателями контрольной группы (интактные животные) и у животных разных возрастных групп. Показано, что реакция взрослых и молодых животных на многократную иммунизацию отличается в наборе и интенсивности синтеза разных типов белков.

Ключевые слова: иммунизация животных, электрофорез на пленках из ацетата целлюлозы, электрофорез в полиакриламидном геле, белковые фракции.