

УДК 57.083.36

© Е.М. Климова, Т.И. Кордон, Е.В. Лавинская, О.В. Звягинцева, 2010.

ИЗМЕНЕНИЕ ЦИТОТОКСИЧНОСТИ, СООТНОШЕНИЯ БЕЛКОВЫХ ФРАКЦИЙ И ПОКАЗАТЕЛЕЙ ГУМОРАЛЬНОГО ИММУНИТЕТА У ЖИВОТНЫХ ПОСЛЕ ИММУНИЗАЦИИ СЫВОРОТКОЙ КРОВИ, СОДЕРЖАЩЕЙ ЦИТОТОКСИЧЕСКИЕ МИАСТОГЕННЫЕ ФАКТОРЫ

Е.М. Климова, Т.И. Кордон, Е.В. Лавинская, О.В. Звягинцева

ГУ «Институт общей и неотложной хирургии» АМН Украины (директор – проф. Бойко В.В.),
диагностическая лаборатория (зав. лабораторией – д.б.н. Е.М. Климова), г. Харьков.

CHANGE OF CYTOTOXICITY, RATIO OF PROTEIN FRACTIONS AND PARAMETERS OF HUMORAL IMMUNITY AT ANIMALS AFTER IMMUNIZATION BY BLOOD SERUM CONTAINING CYTOTOXIC MYASTHOGENOUS FACTORS

Е.М. Klimova, T.I. Kordon, E.V. Lavinskaya, O.V. Zvyagintseva

SUMMARY

The research of the peptide serum factors maintenance of animals blood which have been immunized by serum with various clinical forms autoimmune disease myasthenia is carried out. Significant differences in a percentage ratio of protein fractions in serum of experimental animals after immunization in comparison with control values native serum by a method of electrophoresis on films from acetate of cellulose are revealed. Definition of humoral immunity parameters - concentration of the CIC and PSM by a spectrophotometric method is carried out. The cellular biosensor *Dunaliella viridis* as screening-test of bioindication cytotoxicity in blood serum of experimental animals have used.

ЗМІНА ЦИТОТОКСИЧНОСТІ, СПІВВІДНОШЕННЯ БІЛКОВИХ ФРАКЦІЙ І ПОКАЗНИКІВ ГУМОРАЛЬНОГО ІМУНІТЕТУ У ТВАРИН ПІСЛЯ ІМУНІЗАЦІЇ СИРОВАТКОЮ КРОВІ, ЯКА МІСТИТЬ ЦИТОТОКСИЧНІ МІАСТОГЕННІ ФАКТОРИ

О.М. Клімова, Т.І. Кордон, О.В. Лавінська, О.В. Звягінцева

РЕЗЮМЕ

Проведено дослідження вмісту пептидних сироваткових факторів у сироватці крові тварин, яких імунізували сироваткою хворих з різними клінічними формами автоімунного захворювання міастенії. Виявлені достовірні відмінності в співвідношенні білкових фракцій у порівнянні з контрольними показниками методом електрофорезу на плівках із ацетату целюлози. Проведено визначення показників гуморального імунітету – концентрації ЦІК та ПСММ спектрофотометричним методом. Використовували клітинний біосенсор *Dunaliella viridis* в якості скринінг-тесту біоіндикації цитотоксичності в сироватці експериментальних тварин.

Ключевые слова: пептидный фактор, иммунизация животных, электрофорез, аутоиммунное заболевание, клеточный биосенсор.

На воздействие различных видов стресса (повышение температуры, угнетение энергетического обмена, заражение вирусами, нехватка кислорода или глюкозы, повреждение окислителями, химическими препаратами, тяжелыми металлами и др.) все клетки, в том числе клетки млекопитающих и человека, отвечают стереотипной реакцией, охватывающей ядерный аппарат и компоненты цитоплазмы. В основе этой реакции лежит резкое изменение характера экспрессии генов. Она проявляется усилением синтеза особой группы защитных стрессорных белков при

подавлении продукции остальных. Повышенная экспрессия белков стресса защищает клетку, стабилизируя денатурированные или неправильно свернутые пептиды. Они предотвращают агрегацию белков и их дальнейшее повреждение в условиях нарушенного метаболизма клетки, способствуют разборке и расщеплению возникших белковых агрегатов. Например, накапливаясь при вредных воздействиях, белки теплового шока помогают клетке поддерживать гомеостаз в условиях стресса, осуществляя мембранные сигнальные функции. Стрессорные белки реагиру-

ют не только на внешние стрессовые ситуации, но также могут проявляться при метаболических нарушениях, происходящих в организме, влияя на канцерогенез и активируя иммунную систему. Другими словами, белки стресса служат биологическими маркерами неблагоприятного состояния организма и поливалентными сигнальными молекулами [1].

В связи с этим постоянно разрабатывается и совершенствуется методология скрининга, селекции и определения динамических изменений концентрации и конформации пептидов в измененных в результате травмирующих агентов клетках. Целесообразно проведение фундаментальных экспериментальных исследований, посвященных оценке спектра и содержания регуляторных пептидов, относящихся к классу стрессорных белков, образующихся при различных стрессовых нагрузках на организм. Такого рода пептиды могут образовываться в результате катаболизма высокомолекулярных иммуноглобулиновых антител синтезом *de novo*, в том числе и при аутоиммунных заболеваниях [6].

Возрастает необходимость в тонкой дифференциальной диагностике этиологических факторов широко распространенных аутоиммунных заболеваний, к которым относится генерализованная миастения, сопровождающаяся мышечной слабостью, в том числе и дыхательной мускулатуры [1, 6]. Известно, что данное заболевание вызывают цитотоксические миастогенные факторы сыворотки крови. К таким факторам могут относиться антитела различной специфичности, продукты катаболизма этих макромолекул и низкомолекулярные адаптерные белки. Поэтому, важен скрининг суммарных цитотоксических факторов при мультифакторных аутоиммунных заболеваниях [2].

Цель работы – исследование цитотоксических сывороточных факторов на экспериментальной модели *in vivo* после иммунизации животных сывороткой крови больных с различными клиническими формами аутоиммунного заболевания – миастении.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Все экспериментальные манипуляции с лабораторными животными проводили в соответствии с нормами Европейской конвенции по биоэтике [9].

Исследования проводились на 15 трехмесячных крысах (самцах) породы Вистар массой 200-220 г. С целью получения сыворотки у экспериментальных животных, содержащей низкомолекулярные и высокомолекулярные цитотоксические факторы, последних иммунизировали сывороткой крови больных, содержащей миастогенные компоненты. Для иммунизации экспериментальных животных использовали сыворотку крови больных с различными клиническими формами миастении: генерализованная миастения и миастения, протекающая на фоне злокачественного поражения тимуса – тимомы.

Во время эксперимента лабораторных животных разделили на 3 группы. Первая группа – крысы, не подвергавшиеся иммунизации (контрольная группа), животным данной группы вводили физиологический раствор. Вторая группа (А) – крысы, иммунизированные сывороткой крови больных с генерализованной миастенией без поражения вилочковой железы. Третья группа (В) – крысы, иммунизированные сывороткой крови больных миастенией, протекающей на фоне злокачественного поражения вилочковой железы (тимомой).

Иммунизацию лабораторных животных проводили путем внутривентриального введения 0,4 мл сыворотки больных, содержащей цитотоксические миастогенные факторы. Повторную иммунизацию проводили через 10 дней. Через 7 дней после вторичной иммунизации у подопытных животных производили забор крови для исследований и оценки факторов гуморального иммунитета.

Для изучения изменения соотношений белковых фракций применяли метод электрофореза на пленках из ацетата целлюлозы, описанный в работе [7], с последующей денситометрией результатов на анализаторе фореграм «АФ-1». Результаты денситометрического анализа считали достоверными при $P > 0,05$.

Исследование цитотоксических факторов проводили с использованием клеточного биосенсора *Dunaliella viridis* по методу [5,8]. Оценку цитотоксичности исследуемых сывороток крови животных, иммунизированных сывороткой крови больных миастенией, проводили по изменению ответа клеточного биосенсора.

Исследование показателей гуморального иммунитета включали определение концентрации циркулирующих иммунных комплексов (ЦИК) и пептидов средней молекулярной массы (ПСММ), которые проводили спектрофотометрическим методом, как описано в работах [3,10].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Эксперимент предполагал оценку сывороточных факторов иммунизированных животных после соответствующей метаболизации с сывороткой крови больных, содержащей цитотоксические факторы различной природы и обладающей потенциальной иммуногенностью, стимулирующей неспецифические реакции и образование стрессорных низкомолекулярных белков.

Проведенные нами исследования показали, что после иммунизации у лабораторных животных по сравнению с интактными животными, которым вводили физиологический раствор, выявлены изменения в индукции структурно-функциональных изменений клеточного биосенсора *D. viridis*, соотношении белковых фракций и показателей гуморального иммунитета [4]. Результаты скрининга цитотоксичности сыворотки крови животных, иммунизирован-

ных сывороткой крови больных с различными типами миастении, с использованием клеточного биосенсора *D. viridis* представлены в таблице 1.

Таблица 1

Структурно-функциональные показатели клеток *D. viridis* в сыворотке экспериментальных животных

| Морфо-функциональные характеристики культуральной взвеси <i>D. viridis</i> | Контроль 1 | Сыворотка крови интактных животных (Контроль 2) | Сыворотка крови животных, иммунизированных сывороткой больных миастенией без поражения тимуса | Сыворотка крови животных, иммунизированных сывороткой больных миастенией с неоплазией тимуса (тимомой) |
|--|------------|---|---|--|
| Морфологические изменения (%) | 2,6±1,43 | 8,4±1,43 | 37,4±7,11* | 46±7,72* |
| Функциональные изменения (%) | 4,4±1,15 | 9,4±2,1 | 60,4±12,1* | 66±6,1* |
| Частота встречаемости агрегатов (%) | - | - | 9,8±4,1 | 8,7±3,2 |

Примечание: *- $p < 0,05$

В результате совместной инкубации контрольного образца клеточной взвеси биосенсора с питательной средой (контроль 1) и сывороткой крови интактных неиммунизированных животных, которым вводили физиологический раствор (контроль 2), не выявили морфологических и функциональных изменений клеток *D. viridis*, превышающих спонтанный уровень. А именно – в контрольном и нативном образцах морфологические и функциональные изменения клеток *D. viridis* соответствовали спонтанному уровню и составляли соответственно: 1) морфологические изменения 2,6% и 8,4%; 2) функциональные изменения 4,4% и 9,4%. Образование микро- и макроагрегатов отсутствовало.

Выявили достоверные увеличения морфологических и функциональных изменений клеток биосенсора после совместной инкубации клеточной взвеси *D. viridis* с сывороткой крови животных, иммунизированных сывороткой, содержащей миастогенные факторы, полученные от больных с аутоиммунной миастенией без морфологических изменений вилочковой железы, Морфологические изменения клеток *D. viridis* в данной группе составили 37,4% при контрольных значениях 2,6% и 8,4% соответственно. Функциональные изменения также более чем в 15 раз превышали контрольные величины и составили 60,4%. Под действием сыворотки клетки биосенсора образовывали микро- и макроагрегаты – до 10% клеток в поле зрения.

Еще более выраженные морфо-функциональные изменения были выявлены после действия сыворотки экспериментальных животных, иммунизи-

рованных сывороткой крови больных миастенией, протекающей на фоне неопластических изменений вилочковой железы (тимомы). Морфологические изменения взвеси клеток биосенсора в 16 раз превышали контрольные спонтанные нарушения и составляли в среднем 46%. Функциональные изменения в 17 раз превышали спонтанный контрольный уровень изменений и составили 66%. Образование агрегатов встречалось с такой же частотой (9%), как и в первой группе.

Таким образом, показано, что под действием цитотоксических сывороточных факторов происходят изменения морфологических и функциональных показателей клеток *D. viridis*. После действия сыворотки крови больных миастенией на экспериментальной модели *in vivo* после иммунизации на лабораторных животных наблюдали эффект, который проявляется в увеличении морфологических и функциональных цитотоксических действий на клетки *D. viridis* в сыворотке крови экспериментальных животных в сравнении с контрольной группой сыворотки крови интактных животных.

Представляет несомненный интерес биохимическая природа цитотоксических факторов, накапливающихся в сыворотке крови экспериментальных животных после иммунизации их различными миастогенными факторами с целью выяснения потенциальных изменений соотношения белковых фракций с различным молекулярным весом. Для этой цели исследовали изменения электрофоретической подвижности белковых фракций у контрольных нативных животных, у животных после иммунизации миасте-

ний без поражения вилочковой железы и у животных после иммунизации миастенией с неоплазией тимуса. Результаты денситометрической оценки со-

держания белковых фракций в исследуемых сыворотках крови экспериментальных животных представлены в таблице 2.

Таблица 2

Процентное соотношение белковых фракций в сыворотке крови экспериментальных животных

| Группа экспериментальных животных | Белковые фракции (%) | | | | |
|--|----------------------|----------------------|----------------------|-------------------|--------------------|
| | Альбумин | α_1 -глобулин | α_2 -глобулин | β -глобулин | γ -глобулин |
| Контроль (сыворотка крови интактных животных) | 57,2 ± 3,69 | 6,04 ± 0,99 | 9,8 ± 1,81 | 14,72 ± 7,31 | 8,46 ± 2,24 |
| Группа А (сыворотка крови животных, иммунизированных сывороткой больных миастенией без поражения тимуса) | 53,3 ± 8,8 | 7,5 ± 7,01 | 7,62 ± 2,68 | 28,8 ± 5,63* | 14,2 ± 4,57* |
| Группа В (сыворотка крови животных, иммунизированных сывороткой больных миастенией с неоплазией тимуса - тимома) | 48,1 ± 19,37* | 16,6 ± 2,49* | 9,6 ± 5,01 | 8,0 ± 7,76* | 17,6 ± 5,5* |

Примечание: * - $p < 0,05$

При анализе соотношения белковых фракций сыворотки крови интактных животных и сыворотки крови животных иммунизированных сывороткой крови больных миастенией, выявили достоверные отличия в соотношении индуцированных иммунизацией белковых фракциях по сравнению с контрольными образцами нативной сыворотки крови. У животных после иммунизации различными миастогенными факторами достоверно снизилась концентрация альбуминовой фракции в обеих исследуемых группах относительно контроля. Данная белковая

фракция снизилась по отношению к контрольной группе на 7% и 16% в группах иммунизированных животных сывороткой больных миастенией (группа А) и тимомой (группа В) соответственно (табл. 1). Значительно увеличилась в обеих исследуемых группах α_1 -глобулиновая фракция, в которой потенциально присутствуют α_1 -антитрипсин, α_1 -липопротеин и α_1 -гликопротеин, относительно контроля. В группе А иммунизированных животных выявили значительное увеличение α_1 -глобулиновой фракции (более чем в 2 раза). А в группе В, напротив, наблюдали

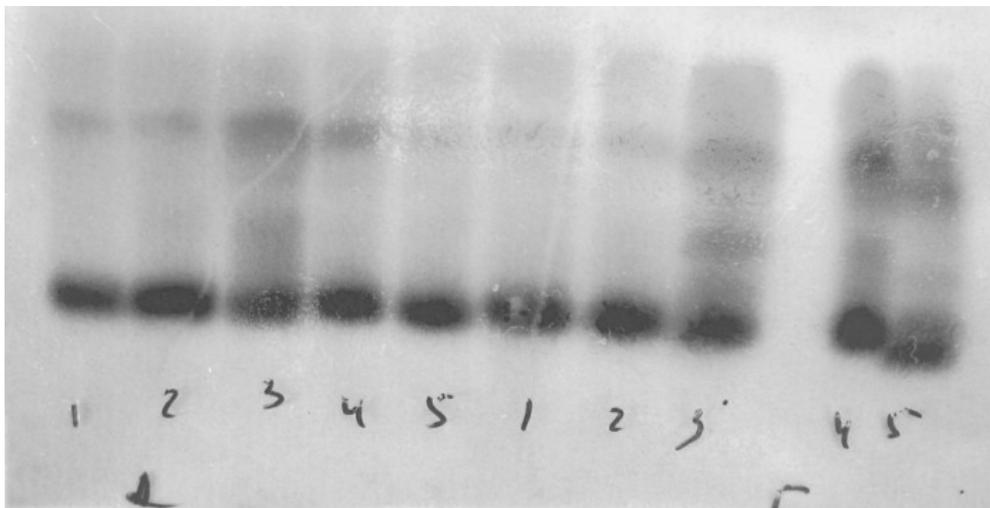


Рис. 1. Разгонка белков сыворотки крови экспериментальных животных групп А и В.

значительное снижение β -глобулиновой фракции, в которую входят белки острой фазы, в частности С-реактивный белок и β_2 -микроглобулин. Снижение α_2 -глобулиновой фракции, в которую входят гаптоглобин, церулоплазмин, аполипопротеин В, α_2 -макроглобулин, наблюдалось на 23% в группе А, и практически не изменилось в группе В. g-глобулиновая фракция, включающая иммуноглобулины, представляющих собой антитела, увеличилась в 1,7 раза и в 2 раза соответственно в группах А и В иммунизированных животных по сравнению с контрольной группой сравнения. Результаты электрофоретической разгонки белковых фракций сыворотки крови экспериментальных животных методом электрофореза на пленках из ацетата целлюлозы приведены на рис. 1.

Изменение соотношения белковых фракций по сравнению с контрольными значениями нативной группы животных может быть взаимосвязано с нарушением нормального функционирования иммунной системы с последующим развитием реакции системного воспаления.

Для выяснения возможных нарушений гуморальных факторов иммунитета исследовали изменение концентрации некоторых гуморальных сывороточных факторов (содержание ЦИК и ПСММ) в исследуемых образцах сыворотки крови экспериментальных животных. Результаты определения концентрации ЦИК и ПСММ в сыворотке экспериментальных животных приведены в таблице 3.

Таблица 3

Концентрация ЦИК и ПСММ в сыворотке крови животных различных групп – в контроле и после иммунизации сывороткой с миастогенными факторами

| Показатель | Контроль (сыворотка крови интактных животных) | Сыворотка крови животных, иммунизированных сывороткой больных миастенией | Сыворотка крови животных, иммунизированных сывороткой больных миастенией с тимомой |
|-----------------------------|---|--|--|
| ЦИК (ед. Е); N (50 – 100) | 74,6 ± 53,2 | 41,88±31,6* | 28,39±25,8* |
| Const ЦИК N (1,1 – 1,5) | 1,41±0,43 | 1,54±0,56 | 1,85±0,13* |
| ПСММ (отн. ед) N (до 0,240) | 0,198±0,0045 | 0,43±0,22* | 0,48±0,22* |

Примечание: * - $p < 0,05$

Из приведенных в таблице 3 данных видно, что показатели концентрации ЦИК в исследуемых группах достоверно отличаются от значений контрольной группы сравнения (74,6 единицы). В исследуемых группах наблюдали значительное снижение концентрации ЦИК по сравнению с контролем до 41,88 единиц в сыворотке крови экспериментальных животных, иммунизированных сывороткой крови больных миастенией и до 28,39 единиц в сыворотке крови экспериментальных животных, иммунизированных сывороткой больных миастенией с неоплазией вилочковой железы соответственно. На фоне отклонения от контрольных значений концентрации ЦИК следует отметить и повышенные значения константы ЦИК, характеризующей молекулярный вес циркулирующих иммунных комплексов: до 1,54 и 1,85 в исследуемых группах соответственно при контрольном значении 1,2.

Концентрация ПСММ в исследуемых группах достоверно отличалась от референтных величин и от значения контрольной группы сравнения. Наблюдалось увеличение концентрации ПСММ в 2,2 раза в сыворотке крови экспериментальных животных, иммунизированных сывороткой крови больных миастенией и в 2,4 раза в сыворотке крови экспериментальных животных, иммунизированных сывороткой

больных миастенией с неоплазией вилочковой железы соответственно в сравнении с показателем в контрольной группе сравнения (0,198 единиц). Это свидетельствует о наличии цитотоксических компонентов, которые образуются при метаболических нарушениях и влияют на молекулярный состав крови.

То есть, увеличение массы циркулирующих иммунных комплексов свидетельствует об увеличении их патогенности. Снижение концентрации ЦИК может происходить за счет их тканевого потребления или усиленного катаболизма иммуноглобулиновых антител, о чем также косвенно свидетельствует значительное увеличение концентрации ПСММ.

ВЫВОДЫ

1. После иммунизации животных сывороткой с цитотоксическими миастогенными факторами выявили увеличение цитотоксичности, изменение соотношения белковых фракций и изменение концентрации гуморальных факторов.

2. Выявили отличия в содержании цитотоксических компонентов в сыворотке крови экспериментальных животных, иммунизированных сывороткой крови больных с различными типами миастении, с использованием скрининг-метода на основе клеточного биосенсора *D. viridis*.

3. Выявили достоверные изменения в электрофоретической подвижности белковых фракций на пленках из ацетата целлюлозы в сыворотке экспериментальных животных, иммунизированных сывороткой с миастогенными факторами. В исследуемых группах иммунизированных животных выявлено достоверное снижение альбуминовой фракции и увеличение γ -глобулиновой фракции. Иммунизация животных сывороткой крови больных со злокачественным поражением тимуса вызывала достоверное увеличение β -глобулиновой фракции. Это свидетельствует о снижении функций иммунной системы в ответ на действие высокоцитотоксических факторов сыворотки крови.

4. Проведенные исследования показателей гуморального иммунитета показали достоверное увеличение концентрации ПСММ и снижение содержания ЦИК (более чем в 2 раза) за счет изменения характера антителообразования в группах иммунизированных животных по сравнению с контрольной группой сравнения.

ЛИТЕРАТУРА

1. Баснакьян И.А., Машилов С.К., Арзуманян А.О. Белки теплового шока бактерий: будущие вакцины или триггеры аутоиммунных заболеваний// Вестник Новосибирского ун-та. Серия: Биология, клиническая медицина. – 2007. – №4. – с. 39–42.
2. Божков А.И., Климова Е.М., Бойко В.В. Связь клинических форм миастении с частотой встречаемости HLA-DR-фенотипа и разработка клеточного биосенсора для оценки этой патологии// Научно-теоретический журнал Президії НАНУ. – 2002. - №3. – с.35 – 40.
3. Гриневич Ю.А., Алферов А.Н. Лабораторное дело, №8, 1981. – 493с.
4. Звягинцева О.В., Климова Е.М. Оценка пептидных сывороточных факторов у экспериментальных животных после их иммунизации сывороткой крови больных, содержащей цитотоксические факторы// В кн. Материалы IX Всеукраинской научной конференции. – Киев, 2009. – с. 140–141.
5. Климова Е.М., Божков А.И., Бойко В.В., Дроздова Л.А. Использование диагностических клеточных биосенсоров при неотложных хирургических состояниях// Биотехнология, биотехника, пищевая технология. - №1. – 2006. – С. 105 – 109.
6. Климова Е.М., Кордон Т.И., Дроздова Л.А., Калашникова Ю.В. Использование клеточного биосенсора для интегральной оценки изменений метаболических и иммунологических показателей у больных различными формами миастении до и после операции // Биологический вестник, 2007, т.11, № 2, с. 9-13.
7. Николайчук В.В., Кирковский В.В. Лабораторное дело №10, 1991, с. 13 – 18.
8. Процес діагностики і прогнозу клінічного перебігу патологічного процесу: Патент на корисну модель UA № 19128 / Клімова О.М., Божков А.І., Бойко В.В. – Зареєстр. 24.02.2006. – 8с.
9. Діагностика міастенії за допомогою клітинних біосенсорів: патент на корисну модель UA № 19128 / Клімова О.М., Божков А.І., Бойко В.В. – Зареєстр. 24.02.2006. – 8с.
10. Найданова І.А. Ефективність застосування антибіотиків при лікуванні міастенії. – 1999 р. – 12 – н. 25 – 32.