

УДК 57.084.1, 57.088.1, 57.083.3

ИЗМЕНЕНИЕ СООТНОШЕНИЯ БЕЛКОВЫХ ФРАКЦИЙ И КОНЦЕНТРАЦИИ ГУМОРАЛЬНЫХ СЫВОРОТОЧНЫХ ФАКТОРОВ ПОСЛЕ ДЕЙСТВИЯ СЕРНОКИСЛОЙ МЕДИ У ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ ЖИВОТНЫХ

Климова Е.М.¹, Звягинцева О.В.², Божков А.И.³

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

²*Национальный технический университет «ХПИ», Харьков, Украина*

³*НИИ Биологии Харьковского национального университета им. В.Н. Каразина, Харьков, Украина*

E-mail: o_zvyagintseva@mail.ru

Проведены исследования содержания белковых сывороточных факторов у экспериментальных животных после действия сернокислрой меди, параллельного действия сернокислрой меди и композитного препарата, композитного препарата. Выявлен полиморфизм белковых фракций сыворотки крови у экспериментальных животных по сравнению с показателями контрольной группы. Выявлены изменения концентрации факторов гуморального иммунитета – циркулирующих иммунных комплексов, пептидов средней молекулярной массы, а также иммуноглобулинов класса А, М, G у экспериментальных животных.

Ключевые слова: электрофорез в полиакриламидном геле, белковые фракции, циркулирующие иммунные комплексы, пептиды средней молекулярной массы, иммуноглобулины.

ВВЕДЕНИЕ

Известно, что в ответ на токсические воздействия в организме синтезируются иммуноглобулиновые антитела стрессорные и адаптерные белки, которые обеспечивают клеточный гомеостаз в условиях стресса [1-3]. Некоторые антитела и стрессовые белки могут способствовать усилению деструкции и аутолизу клеток и тканей [4]. Для предотвращения избыточного аутолиза ведутся поиски адекватных протекторов, которые могут предотвращать развитие необратимых метаболических нарушений после действия стрессорных факторов [5, 6].

Как известно мощным стрессорным фактором, присутствующим в окружающей среде может быть воздействие тяжелых металлов, как одного из многих загрязнителей. Среди металлов-токсикантов выделена приоритетная группа. В нее входят кадмий, медь, мышьяк, никель, ртуть, свинец, цинк и хром, как наиболее опасные для живых организмов. Избыточное влияние тяжелых металлов на живые организмы вызывает нарушения физиологических, биохимических процессов [7, 8] и приводит к увеличению синтеза стрессорных белков, так называемых белков теплового шока, шаперонов, адаптерных белков [9, 10]. Есть литературные данные, что в результате многократных последовательных введений ионов тяжелых металлов в организме формируется резистентность даже к летальным дозам этих

металлов, можно полагать, что именно стрессорные белки специфически связывают ионы тяжелых металлов [8, 11].

Целью исследования явилось изучение соотношения белковых фракций сыворотки крови и изменения концентрации гуморальных сывороточных факторов после хронического токсического действия сернокислой меди (CuSO_4) и олигопептидного композитного препарата у экспериментальных животных.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Все экспериментальные манипуляции с лабораторными животными проводили в соответствии с нормами Европейской конвенции по биоэтике [12].

Исследования проводились в трех различных сериях экспериментов на трехмесячных крысах-самцах линии Вистар в количестве 48 животных. Животных разделили на 4 группы: 1-ая группа – контрольная группа интактных животных, которым перорально через зонд вводили физиологический раствор. Животным 2-ой группы внутрибрюшинно вводили CuSO_4 . В 3-ей группе животные параллельно получали композитный препарат и внутрибрюшинные инъекции CuSO_4 . В 4-ей группе животным вводили через зонд композитный препарат.

Инъекции CuSO_4 делали трехкратно каждые 48 часов в объеме 0,32 мг Cu^{2+} на 1 гр массы печени. Данная доза является токсичной, при которой ухудшается соматическое состояние животных (вялость, потливость, отсутствие активности, потеря веса), но без развития летальных исходов.

С целью снижения токсического эффекта после действия CuSO_4 , крысам параллельно вводили олигопептидный композитный препарат (МФ) Композитный препарат вводили ежедневно на протяжении 5 дней в объеме 0,2 мл на 100 гр массы тела.

Животных выводили из опыта на 8-е сутки после последнего введения композитного препарата и CuSO_4 , производили забор крови для дальнейшего анализа. Для исследования сыворотки крови использовали унифицированные стандартные методы исследования гуморальных показателей иммунитета и соотношения белковых фракций в сыворотке крови.

Электрофорез белков сыворотки крови: для изучения изменений соотношений белковых фракций применяли метод электрофореза в градиентном (градиент 7-10 %) полиакриламидном геле (ПААГ) [13]. Верификацию белковых фракций осуществляли в автоматическом режиме с помощью программы Gel eye. Результаты считали достоверными при $P \leq 0,05$.

Исследование показателей гуморального иммунитета: спектрофотометрический метод определения концентрации циркулирующих иммунных комплексов (ЦИК) и их молекулярного веса по величине константы ЦИК (ЦИК_k), пептидов средней молекулярной массы (ПСММ) [14, 15].

Турбодиметрический метод определения концентрации иммуноглобулинов классов А, М, G в сыворотке крови с помощью моноклональных антител (МКАТ) [16].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Проведенные исследования показали, что после введения полулетальной дозы CuSO_4 , одновременного введения CuSO_4 и композитного препарата, введения только композитного препарата у лабораторных животных по сравнению с интактными животными, которым вводили физиологический раствор, выявлены изменения в соотношении белковых фракций сыворотки крови и показателей гуморального иммунитета.

Следует отметить, что соматическое состояние животных после трехкратного введения CuSO_4 , было крайне тяжелым: диарея, слабость, потливость, отсутствие активности, отсутствие аппетита, снижение веса. У животных, которым параллельно вводили CuSO_4 и композитный препарат состояние оценивали как удовлетворительное, крысы были вялыми и не активными по сравнению с контрольной группой животных, но практически сохраняли аппетит и вес, что их выгодно отличало от животных, получавших только CuSO_4 . Следовательно, совместное действие CuSO_4 и композитного препарата снижало токсическое действие катионов Cu^{2+} , т.е. композитный препарат обладал неким протекторным действием.

Электрофоретическое разделение белковых фракций сыворотки крови экспериментальных животных представлено на Рис. 1.

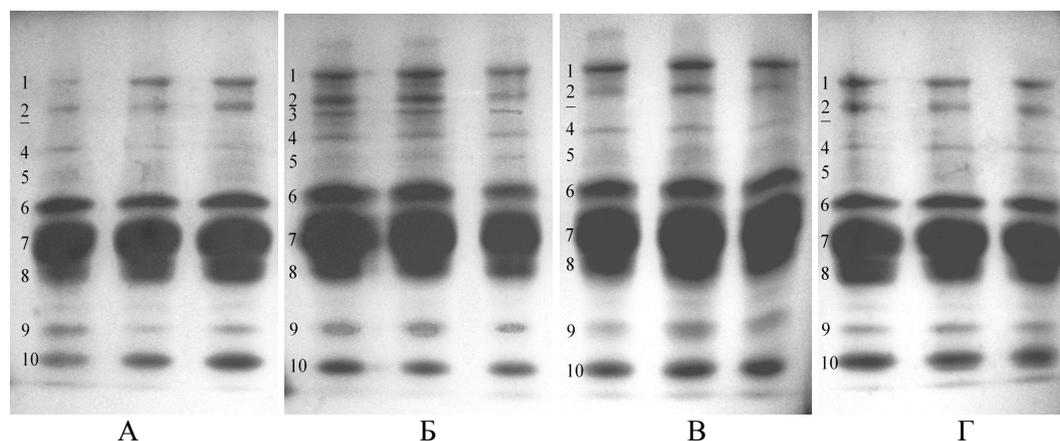


Рис. 1. Электрофореграмма белков сыворотки крови в ПААГ: интактных животных контрольной группы (А); животных, которым вводили сернокислую медь (Б); животных, которым одновременно вводили сернокислую медь и композитный препарат (В); животных, которым вводили композитный препарат (Г): 1) γ -глобулины, 2) β -глобулины, 3) ~ 200 кДа, 4) $\alpha 2$ -глобулины, 5) $\alpha 1$ -глобулины, 6) преальбуминовая фракция, 7) альбумины, 8) ~ 55 кДа, 9) ~ 30 кДа, 10) ~ 20 кДа.

Результаты количественной оценки содержания белковых фракций в исследуемых сыворотках крови экспериментальных животных представлены в Таблице 1.

Таблица 1

Соотношение белковых фракций сыворотки крови экспериментальных животных методом электрофореза в ПААГ

Белковые фракции	Контроль (сыворотка крови интактных животных), %	Группа 2 (сыворотка крови животных, которым вводили CuSO ₄), %	Группа 3 (сыворотка крови животных, которым вводили CuSO ₄ и композитный препарат), %	Группа 4 (сыворотка крови животных, которым вводили композитный препарат), %
γ-глобулины	6,38±1,14	7,43±1,72	10,51±2,06*	7,75±0,9
β-глобулины	4,41±1,76	9,41±2,79*	5,92±0,76	5,58±0,38
фракция ~200 кДа	—	2,90±2,8	—	—
α ₂ -глобулины	3,35±0,62	4,22±0,56	5,26±1,16	3,29±0,29
α ₁ -глобулины	2,79±0,93	3,26±0,78	3,92±0,76	2,69±1,00
преальбуминовая фракция	16,63±2,66	17,65±3,08	14,46±3,20	15,32±1,29
альбумины	36,37±5,22	29,98±4,99	28,77±2,51	30,59±2,74
Постальбуминовая фракция 1 (~55 кДа)	20,24±7,17	15,44±5,57	17,08±7,80	18,37±7,16
постальбуминовая фракция 2 (~30 кДа)	2,76±0,38	3,92±0,40*	2,87±0,26	1,81±0,29*
постальбуминовая фракция 3 (~20 кДа)	7,07±0,28	5,79±0,69*	11,21±0,94*	11,91±0,15*

Примечание: *разница достоверна по сравнению с показателями в контроле, P≤0,05

В результате электрофореза в ПААГ белки сыворотки крови животных разделились до 10 фракций (рис. 1). Выявлены отличия в соотношении белковых фракций сыворотки крови в трех исследуемых группах животных: животных после трехкратного введения CuSO₄, животных после одновременного введения сернокислой меди и композитного препарата и животных после введения композитного препарата по сравнению с интактными животными контрольной группы.

После введения CuSO₄ у экспериментальных животных были выявлены достоверные отличия в изменении соотношения низкомолекулярных белковых фракций. Так, постальбуминовая фракция 2 увеличилась на 29,6 %, постальбуминовая фракция 3 уменьшилась на 18,1 % по сравнению с контрольной

группой. β -глобулиновая фракция, в которую входят С-реактивный белок, липопротеиды низкой плотности, трансферрин, С3- С4-компоненты системы комплемента, фибриноген и др. достоверно увеличилась в 2 раза по сравнению с животными контрольной группы. Следует отметить, что у 83,3% животных этой группы выявлено наличие преальбуминовой фракции порядка 200 кДа, которой нет в сыворотке крови остальных экспериментальных групп, в эту фракцию могут входить металлотионины, синтез которых индуцируется тяжелыми металлами или стрессовыми факторами [8, 11].

В группе животных после одновременного введения CuSO_4 и комбинированного препарата постальбуминовая фракция 2 была на уровне показателей контрольной группы животных, а постальбуминовая фракция 3 увеличилась в 1,5 раза по сравнению с группой контрольных животных. Фракция γ -глобулинов возросла в 1,6 раза по сравнению с показателями в контрольной группе животных, что свидетельствует об активации иммуноглобулиновых антител для нейтрализации токсических катионов Cu^{2+} .

После действия комбинированного препарата у животных, в отличие от группы животных, которым вводили CuSO_4 , уменьшилась постальбуминовая фракция 2 в 1,5 раза и увеличилась постальбуминовая фракция 3 в 1,6 раза по сравнению с контрольной группой.

Постальбуминовые фракции 2 (ММ ~30 кДа) и 3 (ММ ~20 кДа) функционально могут представлять группу стрессорных белков. Так, под действием CuSO_4 могут формироваться стрессорные белки, входящие в постальбуминовую фракцию 2, а после введения комбинированного препарата могут увеличиваться адаптерные белки, обладающие протекторным действием и входящие в постальбуминовую фракцию 3 [17, 18].

Для выявления изменений гуморальных факторов иммунитета исследовали концентрации ЦИК, ПСММ и иммуноглобулинов в исследуемых образцах сыворотки крови экспериментальных животных.

Результаты определения концентрации ЦИК, ПСММ и иммуноглобулинов класса А, М, G в сыворотке экспериментальных животных приведены в Таблице 2.

В контрольной группе показатели гуморального иммунитета соответствовали референтным величинам.

У животных второй группы после введения CuSO_4 выявили отличия гуморальных показателей от контрольных величин. Под действием CuSO_4 наблюдалась тенденция увеличения концентрации ЦИК, при этом $\text{ЦИК}_к$ снижалась до 0,6 при норме (1,1-1,5), что свидетельствует об уменьшении молекулярной массы ЦИК и увеличении их патогенности. ПСММ возросли на 36,4% под действием токсических катионов Cu^{2+} . Это свидетельствует о наличии цитотоксических компонентов, которые образуются при метаболических нарушениях и влияют на молекулярный состав крови. Концентрация IgA, IgM и IgG оставалась на уровне контроля.

Таблица 2
Концентрация ЦИК, ПСММ и иммуноглобулинов (IgA, IgM, IgG) в сыворотке
крови экспериментальных животных

Показатель	Контроль (сыворотка крови интактных животных)	Группа 2 (сыворотка крови животных, которым вводили CuSO ₄)	Группа 3 (сыворотка крови животных, которым вводили CuSO ₄ и композитный препарат)	Группа 4 (сыворотка крови животных, которым вводили композитный препарат)
ЦИК, ед. Е; N (50 – 100)	58±27,08	90,13±27,95	111,4±24,6	102,2±21,98
ЦИК _к N (1,1 – 1,5)	1,21±0,07	0,6±0,11*	1,13±0,10	1,28±0,06
ПСММ, отн.Е; N (до 0,240)	0,220±0,011	0,30±0,06*	0,251±0,018*	0,220±0,02
IgA, г/л; N (1 - 2)	1,12±0,34	0,89±0,31	0,87±0,15	1,16±0,15
IgM, г/л; N (0,5 – 1,2)	0,74±0,38	0,67±0,28	0,55±0,25	0,31±0,04
IgG, г/л; N (2,2 – 2,8)	2,33±0,67	2,10±0,34	4,12±0,93*	2,11±0,22

Примечание: *разница достоверна по сравнению с показателями в контроле, P≤0,05

У животных, параллельно получавших CuSO₄ и композитный препарат и у животных, получавших только композитный препарат также наблюдалась тенденция увеличения ЦИК, но поскольку ЦИК_к оставалась на уровне нормы, то это означает одно из двух, либо накопившиеся антигены иллюминируются антителами для выведения шлаков, либо ЦИК выходят в кровоток из тканей, где накапливаются и выводятся через почки. В третьей группе животных достоверно увеличилось содержание IgG, что также свидетельствует о повышении антителообразования для нейтрализации токсинов. На основании позитивных сдвигов гуморальных показателей и увеличение γ-глобулиновой фракции у животных при совместном введении CuSO₄ и композитного препарата может быть расценено как протекторное действие препарата.

ВЫВОДЫ

1. Выявили полиморфизм белковых фракций у экспериментальных животных: увеличение количества преальбуминовых фракций у животных после введения CuSO₄, а также количественное изменение низкомолекулярных

- постальбуминовых фракций во всех группах экспериментальных животных по сравнению с животными контрольной группы.
2. Соматическое состояние животных после трехкратного введения CuSO_4 , было крайне тяжелым: диарея, слабость, потливость, отсутствие активности, отсутствие аппетита, снижение веса. У животных, которым параллельно вводили CuSO_4 и комбинированный препарат состояние оценивали как удовлетворительное, крысы были вялыми и не активными по сравнению с контрольной группой животных, но практически сохраняли аппетит и вес, что их выгодно отличало от животных, получавших только CuSO_4 . Следовательно, совместное действие CuSO_4 и комбинированного препарата снижало токсическое действие катионов Cu^{2+} , т.е. комбинированный препарат обладал неким протекторным действием.
 3. Проведенные исследования показателей гуморального иммунитета показали достоверное увеличение концентрации ПСММ и увеличение патогенности ЦИК в ответ на экзогенное действие CuSO_4 за счет изменения характера антителообразования. А введение комбинированного препарата способствует активации синтеза иммуноглобулиновых антител для нейтрализации катионов Cu^{2+} и выведения их из организма.
 4. После токсического действия CuSO_4 на модели экспериментальных животных выявлены достоверные изменения в соотношении низкомолекулярных постальбуминовых белковых фракций. Показано, что в ответ на экзогенное действие CuSO_4 идет формирование стрессорных белков, входящих в постальбуминовую фракцию 2 с ММ ~30 кДа. Увеличение этой фракции может формироваться под действием токсических катионов Cu^{2+} . У животных после одновременного введения CuSO_4 и комбинированного препарата, и у животных после введения только комбинированного препарата увеличивается постальбуминовая фракция 3 с ММ ~20 кДа, которая может состоять из белков, обладающих протекторным действием.

Список литературы

1. Продукция белков теплового шока, цитокинов и оксида азота при токсическом стрессе / Е.Г. Новоселова, О.В. Глушкова, Д.А. Черенков [и др.] // Биохимия. – 2006. – Т. 71, № 4. – С. 471–480.
2. Park I. Transmembrane adaptor proteins positively regulating the activation of lymphocytes / Park I, Yun Y // Immune Netw. – 2009– Vol. 9, No. 2. – P. 53–57.
3. The adaptor protein SH2B1 β reduces hydrogen peroxide-induced cell death in PC12 cells and hippocampal neurons / Wan-Chen Lu, Chien-Jen Chen, Hui-Chien Hsu [et. al] // Journal of Molecular Signaling. – 2010. – Vol. 5, No. 17 – P. 5–17.
4. Thomas P.J. Defective protein folding as a basis of human disease / P.J. Thomas, B.H. Qu, P.L. Pedersen // Trends Biochem. Sci. – 1995. – Vol. 20. – P. 456–459.
5. Нейропротективные эффекты ноотропного дипептида ГВС_111 при кислородно-глюкозной депривации, глутаматной токсичности и оксидативном стрессе in vitro / Н.А. Андреева, Е.В. Стельмашук, Н.К. Исаев [и др.] // Бюл. эксперим. биол. и мед. – 2000. – Т. 130, № 10. – С. 418–421.
6. Островская Р.У. Эволюция проблемы нейропротекции / Р.У. Островская // Эксперим. и клин. фармакол. – 2003. – Т. 66, № 2. – С. 32–37.
7. Арушанян Э.Б. Иммунологические сдвиги, вызываемые солями тяжелых металлов, и защитная роль эпифиза / Э.Б. Арушанян, Л.Г. Арушанян, К.С. Эльбекьян // Аллергология и иммунология. – 2005. – Т. 6, № 3. – С. 434.

8. Resistance to heavy metal toxicity in organisms under chronic exposure / A. Bozhkov, V. Padalko, V. Dlubovskaya [et al.] // *Indian Journal of Experimental Biology*. – 2010. – Vol. 48 (7). – P. 679–696.
9. Effect of metal ions on DNA conformation and their biological action on genetic structures of cells / S.V. Kornilova, Yu.P. Blagoi, I.P. Moskalenko [et al.] // *Studia Biophysica*. – 1988. – Vol. 123, № 2. – P. 77–84.
10. Heat Shock Response of Eukaryotic Cells / L. Nover, D. Hellmund, D. Neumann [et al.] // *Biol. Zentr.-Bl.* – 1984. – Vol. 103, No 4. – P. 357–435.
11. Проявление эффекта импринтинга в паттерне внутриклеточного распределения ионов меди в печени после многократных введений сернистой меди / А.И. Божков, В.И. Сидоров, В.Л. Длубовская [и др.] // *Биомедицинская химия*. – 2010. – Т. 56, № 2. – С. 195–208.
12. Пустовіт С.В. Розвиток ідей біоетики у європейському контексті: матеріали IV Міжнародного симпозиуму з біоетики / С.В. Пустовіт, В.Л. Кулініченко, О.Г. Карагодіна. – Київ: СФЕРА, 2006. – 160 с.
13. Остерман Л.А. Методы исследования белков и нуклеиновых кислот: Электрофорез и ультрацентрифугирование / Остерман Л. А. – М.: Наука, 1981. – 288 с. – (практическое пособие).
14. Константинова Н.А. Оценка патогенных и непатогенных иммунных комплексов / Константинова Н.А. – М.: Метод. рекомендации МЗ СССР, 1986. – 128 с.
15. Способ определения «средних молекул» / В.В. Николайчук, В.М. Моин, В.В. Кирковский [и др.] // *Лаб. дело*. – 1991. – № 10. – С. 13–18.
16. Гамалея Н.Б. Сравнение двух методов определения иммуноглобулинов классов А, М, G (спектрофотометрия и радиальная иммунодиффузия) / Н.Б. Гамалея, К.А. Мондрус // *Клин. лаб. Диагностика*. – 1994. – № 1. – С. 6–7.
17. Панасенко О.О. Структура и свойства мБТШ / О.О. Панасенко, М.В. Ким, Н.Б. Гусев // *Успехи биол. Химии*. – 2003. – Т. 43. – С. 59–98.
18. Божков А.И. Участие низкомолекулярных термостабильных белков цитозоля в регуляции пролиферации клеток печени / А.И. Божков, А.В. Шмонин, А.М. Белоус // *Доповіди національної академії наук України*. – 1999. – №5. – С. 169–173.

Клімова О.М. Зміна співвідношення білкових фракцій і концентрації гуморальних сироваткових факторів після дії сірчанокислого купрум у експериментальних тварин / О.М. Клімова, О.В. Звягинцева, А.І. Божков // Вчені записки Таврійського національного університету ім. В.І. Вернадського. Серія „Біологія, хімія”. – 2010. – Т. 23 (62), № 4. – С. 117-124.

Проведені дослідження вмісту білкових сироваткових чинників у експериментальних тварин після дії сірчанокислого купрум, паралельної дії сірчанокислого купрум і композитного препарату, композитного препарату. Виявлений поліморфізм білкових фракцій сироватки крові у експериментальних тварин порівняно з показниками контрольної групи. Виявлені зміни концентрації факторів гуморального імунітету – циркулюючих імунних комплексів, пептидів середньої молекулярної маси, а також імуноглобулінів класу А, М, G у експериментальних тварин.

Ключові слова: електрофорез в поліакриламідному гелі, білкові фракції, циркулюючі імунні комплекси, пептиди середньої молекулярної маси, імуноглобуліни.

Klimova E.M. Change of protein fraction ratio and humoral serum factor concentrations after the influence of copper sulfate at experimental animals / E.M. Klimova, O.V. Zvyagintseva, A.I. Bozhkov // Scientific Notes of Taurida V.I. Vernadsky National University. – Series: Biology, chemistry. – 2010. – Vol. 23 (62), No 4. – P. 117-124.

Researches of protein serum factor content at experimental animals after the influence of copper sulfate, parallel influence of copper sulfate and composite preparation, composite preparation are carried out. Blood serum protein fraction polymorphism at experimental animals in comparison with control group values is displayed. Changes of humoral immunity factor concentration – circulatory immune complexes, middle molecular mass peptides, and also immunoglobulins of class A, M, G at experimental animals are revealed.

Keywords: electrophoresis in polyacrylamide gel, protein factions, circulatory immune complexes, middle molecular mass peptides, immunoglobulins.

Поступила в редакцію 02.12.2010 г.