

**ОТРИМАННЯ ТА ХАРАКТЕРИСТИКА ІМУНОГЛОБУЛІНІВ КЛАСУ G  
ІЗ СИРОВАТКИ КРОВІ ЩУРІВ З ХРОНІЧНОЮ АЛКОГОЛЬНОЮ  
ІНТОКСИКАЦІЄЮ**

*Описано метод отримання фракції Ig G із сироватки крові щурів. Антитіла виділяли методом афінної хроматографії на протеїн А сефарозі із зразків, відібраних у контрольних тварин і тих, які зазнали хронічної алкогольної інтоксикації. Показано, що при хронічному вживанні алкоголю, починаючи з 10-ї доби, вміст антитіл у плазмі крові підвищується на 25 %.*

**КЛЮЧОВІ СЛОВА:** імуноглобуліни, хронічна алкогольна інтоксикація, сироватка крові.

ВСТУП. Критерієм стану організму є баланс білкового складу сироватки крові. При патологічних станах цей баланс порушується, внаслідок чого в крові змінюється співвідношення білків і пептидів. Гостра і хронічна алкогольна інтоксикація призводить до зміни співвідношення рівнів багатьох пептидів, що відіграють важливу роль в етіології і патогенезі алкоголізму [1]. Розвиток алкогольної залежності часто супроводжується зміною імунної реакції організму, проте в літературі доступна лише обмежена кількість даних щодо дослідження впливу етанолу на імунну систему. В останні роки значно підвищився інтерес учених до ролі антитіл у процесах регуляції біологічних функцій, а також до можливості визначення рівня деяких автоантитіл як маркерів стану організму за хронічного вживання алкоголю [3, 6].

**МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ.** У роботі було використано модель розвитку гострої хронічної алкогольної інтоксикації щурів, які отримували 30 % розчин етанолу. Етанол вводили з розрахунку 2 мл на 100 г маси тіла тварини протягом 21 доби один раз на добу. Контрольну групу склали щури, яким у тому ж віці внутрішньошлунково вводили воду, яку застосовували для розведення етанолу [2].

Сироватку крові отримували з цільної крові щурів. Для вилучення фібриногену та супутніх білків кров залишали при 37 °С на 4 год у термостаті та в подальшому центрифугували

зразки за 2000 г протягом 40 хв. Отриманий супернатант відбирали та використовували у подальшій роботі.

Антитіла класу G виділяли зі зразків сироватки крові щурів методом афінної хроматографії на протеїн А сефарозі [9]. Для створення оптимальних умов очищення на колонку наносили сироватку зі швидкістю 1 мл/хв у кількості 25 % від загального об'єму носія. Неспецифічно зв'язаний матеріал відмивали десятима об'ємами колонки 50 мМ Na-фосфатним буфером, рН 7,4. Фракцію афінно зв'язаних антитіл елюювали 100 мМ гліцин-HCl, рН 2,2, зі швидкістю 2 мл/хв. Елюат збирали, контролюючи поглинання за довжини хвилі 280 нм та негайно нейтралізували 1 М розчином Триса до рН 7,6. Проби, які містили білок, об'єднували та висолювали розчином сульфату амонію до кінцевої концентрації 45 % і залишали на ніч за температури 4 °С. Після цього центрифугували при 1000 г 30 хв і розчиняли отриманий осад у 0,05 М Na-фосфатному буфері, рН 7,4. Фракцію додатково доочищували для позбавлення від важких та легких ланцюгів імуноглобулінів на колонці із сорбентом Sephadex G75. Хроматографічне розділення проводили у 50 мМ Na-фосфатному буфері, рН 7,4, зі швидкістю 1 мл/хв.

Для перевірки чистоти отриманих антитіл проводили диск-електрофорез у 7,5 % поліакриламідному гелі з додецилсульфатом Na за методом Лемлі [13]. Для відновлення дисульфідних зв'язків застосовували 5 % β-меркаптоетанол. Як маркери використовували суміш білків (Amersham Biosciences) з молеку-

лярними масами 94 кДа (фосфорилаза В), 67 кДа (альбумін), 43 кДа (овальбумін), 30 кДа (ангідроза), 20,1 кДа (соевий інгібітор трипсину), 14,4 (лактальбумін). Електрофорез проводили в апараті для вертикального гелі-електрофорезу (Amersham Biosciences) у пластинах завтовшки 1 мм. Гелі фарбували 0,125 % розчином кумасі G-250 у 25 % ізопропанолі та 10 % оцтової кислоти.

**РЕЗУЛЬТАТИ Й ОБГОВОРЕННЯ.** Вміст імуноглобулінів сироватки крові визначають зазвичай у клінічній практиці, оскільки цей показник надає ключову інформацію про гуморальний імунний статус [4]. Визначення розподілу вмісту імуноглобулінів у загальній популяції є важливим для інтерпретації реферативних значень. Необхідно враховувати істотні розбіжності між підгрупами, які визначаються віком, статтю, способом життя – курінням або вживанням алкоголю [8, 12]. Незважаючи на це, досліджень, присвячених можливому впливу цих факторів на рівень сироваткових імуноглобулінів, не вистачає. Так, повідомляється, що вміст Ig G прямо пропорційно пов'язаний з віком та обернено пропорційно – з курінням і помірним вживанням алкоголю [4]. Прогностичного значення надають асоціації алкоголізму з антигенами системи HLA (human leucocyte antigens). Відомо, що виявлення цих антигенів поєднується з вищою концентрацією імуноглобулінів у плазмі крові [5].

Для дослідження впливу алкоголю на вміст Ig G у сироватці крові щурів, які зазнали хронічної алкогольної інтоксикації, було обрано метод афінної хроматографії на протеїн А сефарозі. Даний метод дозволяє вирішити відразу 2 завдання: виділити чисту фракцію

антитіл, придатну для використання в експериментальній роботі, та визначити їх концентрацію у плазмі крові кожної тварини.

На рисунку 1 показано хроматограму розділення сироватки крові щурів на колонці з протеїн А сефарозою. Зважаючи на умови проведення даного виду хроматографії, пік 2 являє собою практично чисту фракцію імуноглобулінів класу G, які містяться в сироватці. Протеїн А сефароза – афінний сорбент для очищення Ig G, його ємність складає близько 20 мг Ig G на 1 мл гелю, що дозволяє якісно та швидко отримувати продукт.

Для позбавлення можливих домішок важких та легких ланцюгів імуноглобулінів класу G отриманий елюат сироватки крові піддавали хроматографічному очищенню на колонці із сорбентом Sephadex G75. У результаті хроматографічного розділення зразка було отримано 3 піки (рис. 2). Пік 1 містив білки з молекулярною масою 150 кДа, що відповідає молекулярній масі нативних молекул імуноглобулінів класу G. У піках 2 і 3 елюювалися білки з молекулярними масами близько 55 та 25 кДа відповідно, які представляють окремі важкі й легкі ланцюги імуноглобулінів.

На наступному етапі роботи визначали чистоту отриманого препарату Ig G методом диск-електрофорезу в ПААГ з додецилсульфатом Na. Було показано, що отриманий у ході хроматографії, що поділяє за розмірами, елюат містить білок, який за молекулярною масою відповідає антитілам класу G (рис. 3). За відсутності β-меркаптоетанолу білкова фракція мала характерну для імуноглобулінів молекулярну масу 150 кДа, при відновленні дисульфідних зв'язків утворювалися фрагменти з молекулярними масами 26 кДа (легкий лан-

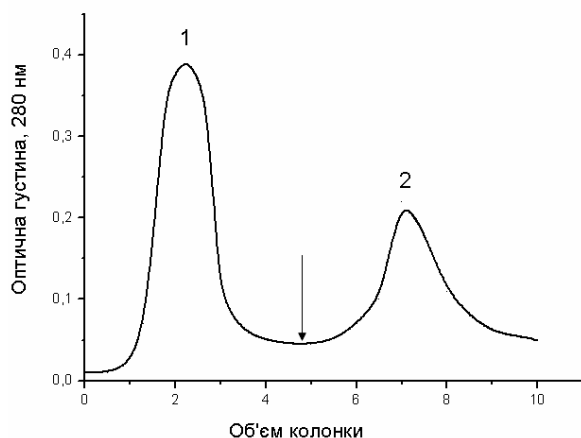


Рис. 1. Хроматограма отримання антитіл класу G із плазми крові щурів: 1 – білки, які неспецифічно зв'язалися з носієм; 2 – фракція імуноглобулінів класу G; стрілкою відмічено зміну 50 мМ Na-фосфатного буфера, рН 7,4, на елюючий 100 мМ гліцин-HCl, рН 2,2.

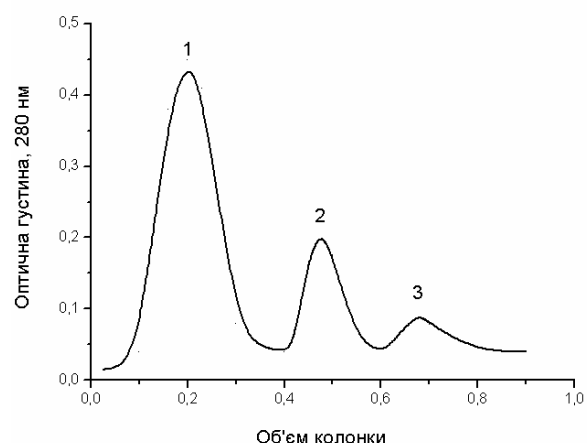


Рис. 2. Хроматограма фракції імуноглобулінів G на колонці Sephadex G75: 1 – фракція, що містить імуноглобуліни G; 2 – фракція, що містить важкі ланцюги імуноглобулінів G; 3 – фракція, що містить легкі ланцюги імуноглобулінів G.

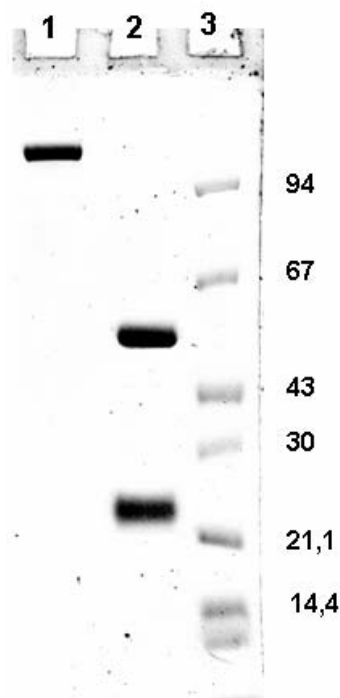


Рис. 3. Електрофореграма антитіл, які було отримано методом афінної хроматографії на колонці з протеїн А сефарозою: 1 – нативні антитіла; 2 – маркери молекулярної маси; 3 – антитіла за присутності  $\beta$ -МЕ (важкі та легкі ланцюги).

цюг) та 55 кДа (важкий ланцюг). Електрофоретичний аналіз також показав відсутність у фракціях супутніх білків.

Аналіз індивідуального пулу антитіл, утворених у кровотоці за хронічної алкогольної інтоксикації, показав, що вміст антитіл зростає під впливом алкоголю, досягаючи максимуму на 10-ту добу експерименту –  $(2,38 \pm 0,35)$  мг/мл. У контрольних зразках вміст антитіл становив  $(1,80 \pm 0,25)$  мг/мл. На 21-шу та 28-му доби вміст

Ig G залишався підвищеним, складаючи  $(2,18 \pm 0,04)$  і  $(2,21 \pm 0,14)$  мг/мл відповідно.

Таким чином, у ході двохетапного хроматографічного очищення сироватки крові щурів із хронічною алкогольною інтоксикацією ми отримали фракцію Ig G, яка містить автоантитіла до власних антигенів організму. Вживання етанолу спричинило швидке зростання рівня Ig G на 25 % відносно контрольного показника, що свідчить про те, що в організмі утворились нові антигени, не характерні для фізіологічного стану тварин. Це можуть бути молекули, які зазнали структурних змін під впливом ацетальдегіду, а також отриманий результат може свідчити про порушення роботи імунної системи. Утворення автоантитіл викликає розлади функціонування всіх органів, але перш за все впливає на систему гемостазу та залози внутрішньої секреції [7, 10]. Відомо, що хронічне вживання алкоголю вважають потенційним фактором ризику захворюваності на цукровий діабет 2-го типу [11]. З огляду на отримані дані, можна припустити, що серед пулу Ig G щурів із хронічною алкогольною інтоксикацією наявні автоантитіла до інсуліну, що є однією з причин розвитку цукрового діабету 2-го типу. Отримана нами фракція антитіл класу G буде використана для встановлення потенційних автоантигенів організму за умов хронічної алкогольної інтоксикації.

**ВИСНОВОК.** Показано, що за гострої хронічної алкогольної інтоксикації в щурів зростає вміст імуноглобулінів класу G на 25 % порівняно з контрольною групою. Це може свідчити про появу автоантитіл до антигенів власного організму в загальному пулі Ig G.

#### СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Выделение пептидных фракций сыворотки крови больных алкоголизмом и исследование их влияния на активность основных карбоксипептидаз / А. К. Корнева, А. Г. Бобылёв, А. В. Кузнецова [и др.] // Известия Пензенского государственного педагогического университета им. В. Г. Белинского. – 2008. – № 10. – С. 181–185.
2. Халилов М. Х. К характеристике некоторых патохимических сдвигов в крови, тканях печени и головного мозга при экспериментальной алкогольной интоксикации / М. Х. Халилов, Ш. Я. Закиходжаев // Вопросы клиники алкоголизма : сб. науч. тр. – Ташкент, 1983. – С. 38–41.
3. Alcohol misuse increases serum antibodies to oxidized LDL and C-reactive protein / H. Alho, P. Sillanaukee, A. Kalela [et al.] // Alcohol. Alcohol. – 2004. – **39**, № 4. – P. 312–315.
4. Alende R. Serum levels of immunoglobulins (IgG, IgA, IgM) in a general adult population and their relationship with alcohol consumption, smoking and common metabolic abnormalities / R. Alende, F. Gude // Clin. Exp. Immunol. – 2008. – **151**, № 1. – P. 42–50.
5. Association of HLA antigens with alcoholic disease / R. Corsico, O. L. Pessino, V. Morales, A. Jmelninsky // J. Stud. Alcohol. – 1988. – **49**, № 6. – P. 546–550.
6. Chronic alcohol consumption is associated with changes in the distribution, immunophenotype, and the inflammatory cytokine secretion profile of circulating dendritic cells / F. J. Laso, J. M. Vaquero, J. Almeida [et al.] // Alcohol. Clin. Exp. Res. – 2007. – **31**, № 5. – P. 846–854.
7. Culina S. Insulin and type 1 diabetes: immune connections / S. Culina, V. Brezar, R. Mallone // Eur. J. Endocrinol. – 2012. [Epub ahead of print].

8. Horn P. S. Reference intervals: an update / P. S. Horn, A. J. Pesce // Clin. Chim. Acta. – 2003. – **334**. – P. 5–23.
9. Huse K. Purification of antibodies by affinity chromatography / K. Huse, H. J. Bohme, G. H. Scholz // J. Biochem. Biophys. Methods. – 2002. – **51**(3). – P. 217–231.
10. Kershaw G. Laboratory identification of factor inhibitors: an update / G. Kershaw, E. J. Favaloro // Pathology. – 2012. – **44**, № 4. – P. 293–302.
11. Kim S. J. Alcoholism and diabetes mellitus / S. J. Kim, D. J. Kim // Diabetes Metab. J. – 2012. – **36**, № 2. – P. 108–115.
12. Sasse E. A. Determination of reference intervals in the clinical laboratory using the proposed guideline National Committee for Clinical Laboratory Standards C28-P / E. A. Sasse // Arch. Pathol. Lab. Med. – 1992. – **116**. – P. 710–713.
13. Selected methods for antibody and nucleic acid probes / Susan Hockfield, S. Carlson, C. Evans [et al.]. – 1993. – **1**.

**И. О. Степанец, Н. К. Кравченко, Л. И. Остапченко**  
КИЕВСКИЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ ТАРАСАШЕВЧЕНКО

## **ПОЛУЧЕНИЕ И ХАРАКТЕРИСТИКА ИММУНОГЛОБУЛИНОВ КЛАССА G ИЗ СЫВОРОТКИ КРОВИ КРЫС С ХРОНИЧЕСКОЙ АЛКОГОЛЬНОЙ ИНТОКСИКАЦИЕЙ**

### **Резюме**

Описан метод получения фракции Ig G из сыворотки крови крыс. Антитела выделяли методом афинной хроматографии на протеин А сепарозе из образцов, полученных от контрольных животных и животных с хронической алкогольной интоксикацией. Показано, что при хроническом употреблении алкоголя, начиная с 10-го дня, содержание антител в плазме крови повышается на 25 %.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА:** иммуноглобулины, хроническая алкогольная интоксикация, сыворотка крови.

**I. O. Stepanets, N. K. Kravchenko, L. I. Ostapchenko**  
TARAS SHEVCHENKO KYIV NATIONAL UNIVERSITY

## **PURIFICATION AND CHARACTERIZATION OF IMMUNOGLOBULINS OF G CLASS FROM THE BLOOD SERUM OF RATS WITH CHRONIC ALCOHOL INTOXICATION**

### **Summary**

The method of Ig G fraction obtaining from blood serum of rats was described. Antibodies were isolated by affinity chromatography on protein A Sepharose from samples taken from the control animals and those who have experienced chronic alcohol intoxication. It was shown that chronic use of alcohol starting from 10-th day caused the increase of antibodies content in the blood plasma on 25 %.

**KEY WORDS:** immunoglobulins, chronic alcohol intoxication, blood serum.

Отримано 21.01.13

**Адреса для листування:** І. О. Степанець, Київський національний університет імені Тараса Шевченка, вул. Володимирська, 64, Київ, 01601, Україна, e-mail: stepanetsinna@bigmir.net.