К ВОПРОСУ ЦЕЛЕСООБРАЗНОСТИ ОПРЕДЕЛЕНИЯ АНТИТЕЛЬНЫХ МАРКЕРОВ ИНФИЦИРОВАНИЯ HBV (АНТИ-HBC, АНТИ-HBS) ПРИ ОБСЛЕДОВАНИИ ДОНОРОВ КРОВИ
(обзор литературы и материалов собственных исследований)

Т.А. Сергеева, В.Р. Шагинян, Е.В. Максименок, А.Л. Гураль, О.Н. Рубан, Л.Г. Емельянова

Целесообразность и необходимость рутинного обследования крови доноров на антитела к коровому антигену (анти-HBc) и к HBsAg (анти-HBs) вируса гепатита В (HBV) для повышения инфекционной безопасности гемотрансфузий широко обсуждается и материалы по этой теме во многом противоречивы. В работе представлены данные литературы и результаты собственных исследований по данному вопросу в условиях ограниченной возможности использования молекулярно-биологических методов исследования в широкой практике службы крови. Приведены аргументы "за" и "против" определения антительных маркеров HBV у доноров крови в Украине в настоящий период.

TO THE QUESTION ON FEASIBILITY OF ANTIBODY HBV MARKERS DETECTION (ANTI-HBC, ANTI-HBS) FOR TESTING OF BLOOD DONORS
(review of literature and own research materials)

T.A. Sergeyeva, V.R. Shaginian, Ye.V. Maksimenok, A.L. Gural, O.N. Ruban, L.G. Emel'yanova

The feasibility and necessity of routine testing of blood donors for antibodies to core antigen (anti-HBc) and HBsAg (anti-HBs) of hepatitis B virus (HBV) infection to increase the safety of blood transfusions has been widely discussed and related materials in many respects contradictory. The paper presents the data in the literature and the results of their own research on this subject in a limited capability to use molecular biology research methods in blood service general practice. The arguments "for" and "against" of HBV antibody markers detection in blood donors in Ukraine at the time are given.

УДК 612.396.22.

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

ДОСЛІДЖЕННЯ СПОРІДНЕНОСТІ IgG ЩУРІВ З ХРОНІЧНОЮ АЛКОГОЛЬНОЮ ІНТОКСИКАЦІЄЮ ДО АНТИГЕНІВ СИРОВАТКИ КРОВІ

Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Україна

Хронічне зловживання алкоголем являє собою одну з основних соціальних і медичних проблем у світі. Вагомим ускладненням за алкоголізму є порушення імунної регуляції, що призводить до імунодефіциту і аутоімунних захворювань. Серед наслідків імунодефіциту виділяють зниження резистентності до інфекційних захворювань, таких як бактеріальна пневмонія, туберкульоз та інші. Крім того, у кровотоці можлива поява циркулюючих аутоантитіл, які можуть істотно впливати на розвиток хвороб печінки [5]. Виявлено, що імуносупресія залежить від кількості вживаного етанолу [10] Показано, що алкоголь чинить вплив на імунітет [6], зокрема, через активність моноцитів. Висунута гіпотеза, згідно з якою гострий алкогольний вплив інгібує запалення шляхом зниження продукції цитокінів моноцитами, що може робити внесок у розвиток імунних порушень після вживання алкоголю [2,4]. Не зважаючи на відсутність систематизованих відомостей, сучасна наукова література відображає інтерес, що зростає, до розуміння основних імунних розладів за алкоголізму.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ

Гостру хронічну алкогольну інтоксикацію (ХАІ) викликали внутрішньо шлунковим введенням 30% етанолу. Етанол вводили з розрахунку 2 мл на 100 г маси тіла тварини протягом 21 доби, один раз на добу [1].

Загальний білок вимірювали за методом Бредфорда [3].

Сироватку отримували з цільної безцитратної крові після видалення згустку. Рідку фазу центрифугували за 2000 g протягом 40 хв.

Загальну фракцію IgG виділяли з сироватки крові методом афінної хроматографії на протеїн А сефарозі. Фракцію антитіл елюювали 100 мМ гліцин-HCl, pH 2,2 [9]. Отримані антитіла доочищували для позбавлення від важких та легких ланцюгів імуноглобулінів на Sephadex G75. Хроматографічне розділення проводили у 50 мМ Na-фосфатному буфері pH 7,4 зі швидкістю 1 мл/хв.

Чистоту препарату IgG контролювали методом диск-електрофорезу в ПААГ у системі Лемлі [11]. Для відновлення дисульфідних зв'язків застосовували 5% β-меркаптоетанол. Гелі фарбували 0,125% розчином кумасі G-250 у 25% ізопропанолі та 10% оцтовій кислоті.

Біотинілювання отриманих IgG проводили згідно методики [7].

Імуноферментний аналіз проводили у мікропланшетах із сорбційною здатністю за стандартною методикою для розчинних білків [8]. Сироватку крові розводили 100 мМ $NaHCO_3$ буфером,

pH 9,6 та інкубували у комірках планшетів 60 хв за 37°С. Для видалення антигена, що не зв'язався, комірки відмивали 50 мМ трис-HCl буфером pH 7,4, з вмістом 130 мМ NaCl. Для блокування неспецифічних місць зв'язування використовували 0,1% Tween 20 у 50 мМ трис-HCl буфері. Антитіла, кон'юговані з біотином, наносили у кінцевій концентрації 10 мкг/мл та інкубували за стандартних умов. Надалі проводили відмивку 50 мМ трис-HCl буфером з вмістом 0,1% Tween 20 та вносини авідин, кон'югований з пероксидазою хрону у розведенні, рекомендованому виробником. Візуалізацію проводили фенілендіаміном у кінцевій концентрації 0,4 мг/мл у 50 мМ фосфатно-цитратному буфері, pH 5,0. Вимірювали оптичне поглинання за довжини хвилі 450 нм.

Досліди проводили на білих нелінійних щурах обох статей масою 160–200 г з дотриманням нормативів Конвенції з біоетики Ради Європи 1997 року, Європейської конвенції про захист хребетних тварин, які використовуються для експериментальних та інших наукових цілей, загальним етичним принципам експериментів на тваринах, ухвалених Першим національним конгресом України з біоетики (вересень 2001 року), інших міжнародних угод та національного законодавства у цій галузі.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Дана робота спрямована на дослідження впливу алкоголю на антигенний склад сироваток крові. Для цього з сироватки крові контрольних щурів та тих, які зазнали хронічної алкогольної

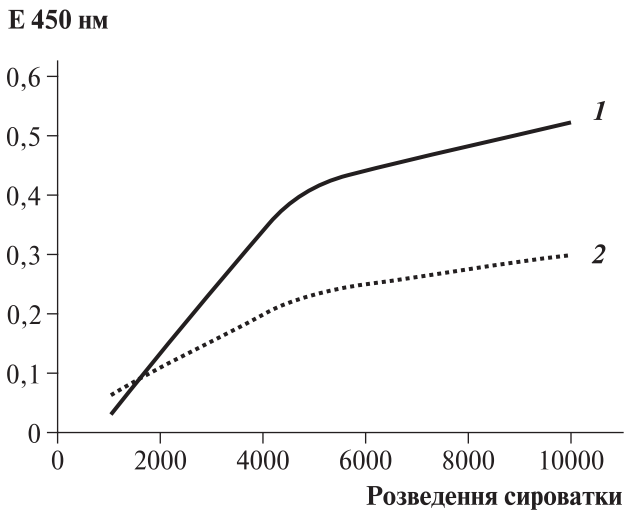

Рис. 1. Спорідненість до антигенів сироватки крові контрольних щурів: 1 — IgGк; 2 — IgGa

інтоксикації методом афінної хроматографії на протеїн А сефарозі були виділені фракції імуноглобулінів класу IgG. Антитіла виділяли з сироваток крові щурів, які отримували розчин етанолу протягом 10, 21 та 28 днів. Показано, що вміст антитіл у плазмі крові зростав під впливом алкоголю, досягаючи максимума на десятий день експерименту — 2,376±0,35 мг/мл. У контрольних зразках вміст антитіл становив 1,8±0,25 мг/мл. На 21 та 28 дні вміст IgG залишався підвищеним, складаючи 2,18±0,048 та 2,21±0,14 мг/мл відповідно. Також було визначено загальний білок сироватки крові щурів. На 10 добу прийому алкоголю цей показник становив 73,3±1,5 мг/мл, у той час як норма складала (82,7±1,9 мг/мл), що на 11% вище показника, характерного для щурів з хронічною алкогольною інтоксикацією.

Для проведення досліджень на плашку наносили сироватку крові обох груп щурів. Для виявлення характеру взаємодії сироватку крові наносили у розведенні від 1:1000 до 1:10000 для досягнення найбільш оптимальної густини антигенів на сорбуючій поверхні плашки, що робить їх доступними для контакту з антитілами. Попередньо біотинільовані фракції IgG, утворені в організмі умовно здорових тварин (IgGк) та тих, які вживали алкоголь (IgGa), використовували у концентрації 0, 01 мг/мл.

На рис. 1 наведено криву, яка відображає спорідненість IgGк та IgGa до антигенів сироватки крові контрольних щурів.

Показано, що IgGa взаємодіють з контрольною сироваткою значно гірше по відношенню до IgGк. Адсорбція IgGк при розведенні контрольної сироватки 1:10000 перевищує даний показник для IgGa на 40%.

На нашу думку, взаємне розміщення обох кривих свідчить про те, що сироватка крові контрольних тварин не містить значної кількості антигенів фракції IgGa. Це можуть бути білки, кон'юговані з ацетальдегідом, такі молекули відсутні у сироватці крові відносно здорових тварин. Оскільки для проведення експерименту було використано однакові кількості фракцій IgGк та IgGa, отриманий результат свідчить про значну різницю у композиції антитіл у цих фракціях.

На наступному етапі було використано аналогічну модельну систему, але досліджували спорідненість IgGк та IgGa до антигенів сироватки крові щурів з хронічною алкогольною інтоксикацією (рис. 2). Для роботи використовували

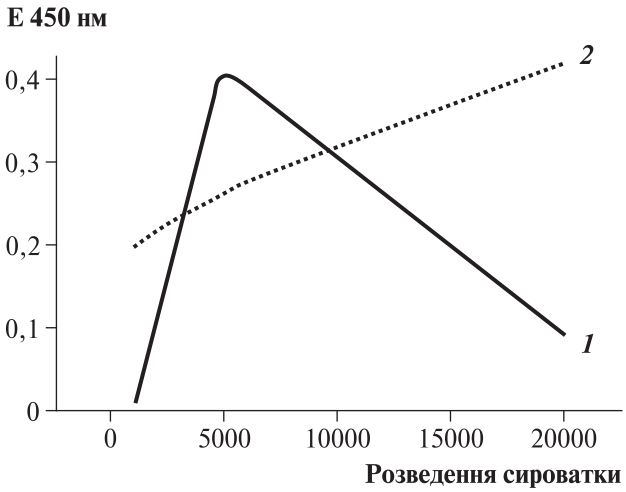

Рис. 2. Спорідненість до антигенів сироватки крові щурів з хронічною алкогольною інтоксикацією: 1 — IgGк; 2 — IgGa

сироватку крові, отриману на 10 добу прийому алкоголю. При дослідженні спорідненості IgGк до антигенів, утворених під впливом етанолу, було виявлено точку насичення, яка відповідала розведенню сироватки крові 1:5000. Для кривої, яка характеризує спорідненість IgGa до антигенів материнської сироватки, навпаки, характерне постійне зростання адсорбції зі збільшенням титру сироватки.

Такий результат може пояснюватись тим, що сироватка крові тварин з хронічною алкогольною інтоксикацією містить антигени, які є спільними для фракцій IgGк та IgGa. Проте, кількість цих антигенів значно варіює ддя обох випадків. Так, точка насичення кривої "1" вказує на те, що IgGк адсорбували усі цільові антигени. Кількість цих молекул є значно меншою, ніж кількість антигенів для IgGa, про що свідчить відсутність точки насичення кривої "2". Адсорбція фракції IgGa продовжує зростати при розведенні антигену 1:20000.

Висновки. Проведені дослідження вказують на значну різницю антигенного складу сироватки крові контрольних щурів та щурів з хронічною алкогольною інтоксикацією. У пулі IgG щурів з хронічною алкогольною інтоксикацією виявлено антитіла, які відсутні у композиції IgG контрольних щурів. Дані антитіла можуть взаємодіяти з білками плазми крові, змінюючи її характеристики, що супроводжується утворенням комплексів антиген-антитіло та зміною ферментного складу.

ЛІТЕРАТУРА

1. *Халилов М. Х., Закихорджаев Ш. Я. К характеристике некоторых патохимических сдвигов в крови, тканях печени и головного мозга при экспериментальной алкогольной интоксикации // Вопросы клиники алкоголизма: Сб. науч. тр. — Ташкент, 1983. — С. 38–41.*
2. *Balasubramaniyan V., Murugaiyan G., Shukla R. et al. Leptin downregulates ethanol-induced secretion of proinflammatory cytokines and growth factor // Cytokine. — 2007. — Vol. 37, № 1. — P. 96–100.*
3. *Bradford M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding // Anal. Biochem. — 1976. — Vol. 72. — P. 248–254.*
4. *Chen C.P. Boyadjieva N.I., Advis J.P. et al. Ethanol suppression of the hypothalamic proopiomelanocortin level and the splenic NK cell cytolytic activity is associated with a reduction in the expression of proinflammatory cytokines but not anti-inflammatory cytokines in neuroendocrine and immune cells // Alcohol. Clin. Exp. Res. — 2006. — Vol. 30, № 11. — P. 1925–1932.*
5. *Cook R.T. Alcohol abuse, alcoholism, and damage to the immune system — a review // Alkohol. Clin. Exp. Res. — 1998. — Vol. 22, № 9. — P. 1927–1942.*
6. *Frank J., Witte K., Schrödl W. et al. Chronic alcoholism causes deleterious conditioning of innate immunity // Alcohol Alcohol. — 2004. — Vol. 39, № 5. — P. 386–392.*
7. *Gilting G., Bayer E., Wilchek M. Studies on the biotin-binding site of avidin // Biochem. J. — 1987. — Vol. 2422. — P. 923–926.*
8. *Hockfield S., Carlson S., Evans C. et al. Selected methods for antibody and nucleic acid probes // USA: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1993. — 680 p.*
9. *Huse K., Böhme H.J., Scholz G.H. Purification of antibodies by affinity chromatography // 2002. — Vol. 51, № 3. — P. 217–231.*
10. *Stoltz D.A. Nelson S., Kolls J.K. et al. Effects of in vitro ethanol on tumor necrosis factor-alpha production by blood obtained from simian immunodeficiency virus-infected rhesus macaques // Alcohol. Clin. Exp. Res. — 2002. — Vol. 26, № 4. — P. 527–534.*
11. *Weber K., Osborn M. The reliability of molecular weight determinations by dodecyl sulfate-polyacriylamide gel electrophoresis // J. Biol. Chem. — 1969. — Vol. 244, № 16. — P. 4406–4412.*

ИССЛЕДОВАНИЕ СРОДСТВА IgG КРЫС С ХРОНИЧЕСКОЙ АЛКОГОЛЬНОЙ ИНТОКСИКАЦИЕЙ К АНТИГЕНАМ СЫВОРОТКИ КРОВИ

Н.К. Кравченко, И.А. Степанец, А.Н. Савчук, Л.И. Остапченко

Показано, что сыворотки крови контрольных крыс и крыс с хронической алкогольной интоксикацией имеют разный антигенный состав. Установлено, что фракция IgG крыс с хронической алкогольной интоксикацией содержит антитела, которые отсутствуют в композиции IgG контрольных животных.

STUDY ON AFFINITY OF IgG FRACTION OF RATS WITH CHRONIC ALCOHOL INTOXICATION TO ANTIGENES OF BLOOD SERUM

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

Summary. It was shown that the blood serum of control rats and rats with chronic alcohol intoxication have different antigen composition. IgG fraction of rats with chronic alcohol intoxication contained antibodies that were missed in the composition of control animals IgG.