

УДК 616-097.3-092.9

Измельцев С.В., Фефелова Е.В., Терешков П.П., Дутов А.А., Цыбиков Н.Н.

## АУТОАНТИТЕЛА К АЛЬБУМИНУ, МОДИФИЦИРОВАННОМУ ГОМОЦИСТЕИНОМ, В ЭКСПЕРИМЕНТЕ

**ГБОУ ВПО Читинская государственная медицинская академия**

*Исследован уровень гомоцистеина и аутоантител к комплексу сывороточного альбумина с гомоцистеином у интактных крыс и животных с экспериментальным иммунодефицитом. Обнаружено, что у интактных крыс, после введения гомоцистеина происходит снижение его концентрации в сыворотке крови на фоне возрастания титра аутоантител. У иммунодефектных крыс при снижении титра аутоантител наблюдается повышение уровня гомоцистеина.*

**Ключевые слова:** гомоцистеин, модифицированный альбумин, аутоантитела.

**Izmestyev S.V., Fefelova E.V., Tereshkov P.P., Dutov A.A., Tsybikov N.N.  
INVESTIGATION OF AUTOANTIBODIES TO HOMOCYSTEINE-MODIFIED  
ALBUMIN IN EXPERIMENT**

**GBOU VPO Chita state medical academy, Chita**

*Level of homocysteine and autoantibodies to complex of serum albumin with homocysteine were examined in intact rats and rats with experimental immunodeficiency. Lowering of homocysteine level in combination with increase of autoantibodies titer after homocysteine introduction was detected in intact rats. Increase of homocysteine level in combination with lowering of autoantibodies titer was registered in rats with immunodeficiency.*

**Key words:** homocysteine, modified albumin, autoantibodies.

### Введение

Известно, что в качестве одного из независимых факторов риска атеросклероза и тромбоза коронарных, церебральных и других сосудов, наряду с гиперхолестеринемией, курением, избыточной массой тела и т.д., рассматривают повышенный уровень гомоцистеина, который инициирует повреждение эндотелиальных клеток и тем самым запускает процесс образования атеросклеротической бляшки [3, 4, 6]. Более того, согласно многочисленным исследованиям, гомоцистеин является причиной атеротромбоза с последующим развитием фатальных катастроф в различных отделах сосудистой системы [5, 7, 10]. Наряду со сказанным, известно, что метаболит данной аминокислоты гомоцистеин-тиолактон обладает выраженной способностью образовывать химически прочные связи с белками организма с модификацией последних [8, 9]. Имеются единичные исследования,

свидетельствующие о возможности комплексирования самого гомоцистеина с белками плазмы крови и, особенно, с альбумином [11]. Не исключено, что комплексы альбумина с гомоцистеином обладают аутоантигенными свойствами и вызывают образование аутоантител [12]. Сформированные иммунные комплексы могут явиться дополнительным механизмом элиминации высокой концентрации гомоцистеина. Даный вопрос в современной литературе до настоящего времени не освещен, что и составило предмет нашего исследования.

**Цель исследования:** изучить уровень гомоцистеина и аутоантител к альбумину, модифицированному гомоцистеином, у интактных крыс и крыс с экспериментальным гуморальным иммунодефицитом.

### Задачи исследования:

1. Смоделировать гуморальный иммунодефицит у лабораторных крыс с подтверждением методом проточной цитометрии.

2. Получить конъюгат сывороточного альбумина крысы с гомоцистеином (модифицированный альбумин).
3. Определить уровень гомоцистеина в сыворотке крови у интактных крыс и животных с экспериментальным иммунодефицитом.
4. Оценить содержание аутоантител к альбумину, модифицированному гомоцистеином в сыворотке крови у интактных крыс и животных с экспериментальным иммунодефицитом.

#### **Материалы и методы исследования.**

В эксперимент включены 40 белых беспородных крыс, самцов, средней массой 150 гр., из которых у 20-ти крыс вызывали иммунодефицит, 20 - составили контрольную группу.

На первом этапе получали модель иммунодефицита, путем внутрибрюшинного введения раствора циклофосфана быстрорастворимого (ООО "ЛЭНС-фарм", дочерняя компания ОАО "Верофарм". Регистрационный номер: Р N 000459/01) в дозе 100 мг/м<sup>2</sup> 2 раза в неделю. Расчет площади поверхности тела животных производили по формуле Миха:  $S (\text{см}^2) = K3\sqrt{m^2} (\text{г})$ . К - коэффициент, равный для крысы - 9,13 - 11,05.

Наличие иммунодефицита подтверждалось определением иммунограммы методом цитометрии на проточном цитофлюорометре FC500 (BC, США) согласно прилагаемой инструкции.

На втором этапе у крыс забирали кровь из подключичной вены, затем 10-ти интактным и 10-ти крысам с иммунодефицитом ввели гомоцистеин в концентрации 100 мкмоль на 1 мл ОЦК. 10-ти интактным и 10-ти крысам с иммунодефицитом ввели гомоцистеин-тиолактон в концентрации 100 мкмоль на 1 мл ОЦК. Расчет ОЦК крысы проводили в соответствии с соотношением 5-7 мл/100 г. Через 6 часов кровь забирали вновь. Далее ежедневно вводили гомоцистеин и гомоцистеин-тиолактон в течение 9-ти дней на фоне введения цитостатика и интактным крысам. Животных вывели из эксперимента путем кровопотери под наркозом.

Получение крысиного альбумина осуществляли центрифугированием сыворот-

ки крови с ультрафильтрацией с порогом разделения 100 КДа для отделения крупнодисперсных белков, а затем ультрафильтрацией с порогом 50 КДа с целью отделить белки меньшей молекулярной массы.

Далее получали модифицированный крысиный альбумин и конъюгиравали его глутаровым альдегидом на эритроцитах.

Для получения модифицированного альбумина гомоцистеин ("Fluca", Германия) в концентрации 150 мкмоль/л инкубировали с 5% раствором крысиного сывороточного альбумина в течение 24 часов при температуре 4°C и затем 60 минут при 37°C [2].

Трижды отмытые физиологическим раствором эритроциты человека разводили 1% глутаровым альдегидом до 5% супензии, инкубировали 30 мин при 0°C при периодическом перемешивании, затем отмывали 5 раз 0,15 M NaCl и 5 раз дистиллированной водой. Далее к 0,5 мл отмытых эритроцитов добавляли 2,5 мл раствора модифицированного альбумина в 0,15 M фосфатном буфере с pH 7,4. Смесь инкубировали 1 час при комнатной температуре. После 3-х кратной отмычки эритроциты, конъюгированные с модифицированным альбумином, использовали для проведения РПГА.

РПГА проводили в 2-х вариантах: с определением всех классов Ig, и с определением цистеин-устойчивых антител, т. е. класса IgG, согласно методическим рекомендациям по постановке реакции пассивной гемагглютинации с цистеиновой пробой с целью диагностики сальмонеллезов (Центральный НИИ эпидемиологии Министерства здравоохранения СССР). Основанием для подобного дифференцированного определения иммуноглобулинов является то, что при обработке сыворотки некоторыми редуцирующими веществами, в частности цистеином, IgG-антитела относительно устойчивы, тогда как IgM и IgA-антитела не специфически инактивируются, выпадая в осадок, что связано с большей молекулярной массой их по сравнению с IgG. Это позволяет определить удельное содержание IgG в сыворотке.

Цистеин в соотношении 15 мг на 1 мл растворяли 0,1 M раствором NaOH и при

значении pH 7,0-7,2 доводили до нужного объема 0,85% раствором NaCl. Одну часть сыворотки экспериментальных крыс, разведенную 1:5 физиологическим раствором, смешивали с равным объемом раствора цистеина, помещали в пробирку и заливали слоем стерильного вазелинового масла, вторую часть сыворотки (без цистеина) также заливали слоем вазелинового масла. Пробирки с сыворотками, обработанными и необработанными цистеином, выдерживали в термостате при 37°C в течение 18 ч.

Далее обе части сыворотки титровали в планшетах для иммунологических реакций в нескольких парных рядах соответственно числу эритроцитарных диагностикумов, начиная с разведения 1:20. Для разведения использовали забуференный 0,85% раствор NaCl (фосфатный буфер с pH 7,0-7,2). Эритроциты, конъюгированные с модифицированным альбумином, в 2,5% разведении вносили в каждую лунку разведения сыворотки в объеме 100 мкл. Каждый эритроцитарный диагностикум вносили в два ряда разведений сыворотки (обработанной и необработанной цистеином). В одну из лунок, содержащую растворитель без испытуемой сыворотки, вносили равный объем диагностикума для контроля спонтанной агглютинации. Контролем также служили разведения исследуемых сывороток с несенсибилизованными эритроцитами, а также с эритроцитами, сенсибилизованными немодифицированным альбумином. Через 2 часа учитывали результаты по обычной для РПГА методике. Положительной считали реакцию в случае образования ровного слоя агглютинированных эритроцитов по всей поверхности лунки ("зонтик"), отрицательной - компактный осадок эритроцитов в центре лунки ("пуговка"). Количественную оценку проводили через отрицательный десятичный логарифм от титра разведения сыворотки, при котором регистрировалась положительная реакция.

Уровень гомоцистеина у экспериментальных животных определяли также по методу Дутова А. А. и соавторов [1]. Полученный результат выражали в мкмоль/л.

Статистическую обработку полученных

данных выполняли в программах Microsoft Excel и STATISTICA 6,0 с использованием непараметрического критерия Манна-Уитни. Статистически значимыми считались различия при значении  $p < 0,05$ .

### Результаты и обсуждение.

Данные, отражающие уровень гомоцистеина в сыворотке экспериментальных животных, представлены в таблице 1; результаты проведенной РПГА исследуемых сывороток с эритроцитами, сенсибилизованными модифицированным альбумином - в таблице 2. Контрольные РПГА без испытуемой сыворотки; РПГА с несенсибилизованным эритроцитарным диагностикумом; а также с эритроцитами, сенсибилизованными немодифицированным альбумином, явились отрицательными.

Таблица 1  
Уровень гомоцистеина  
у экспериментальных крыс  
в мкмоль/л (Ме (25%; 75%))

Группа	До нагрузки	Через 6 часов после введения		После 9-дневного введения	
		гомоцистеина	гомоцистеин-тиолактона	гомоцистеина	гомоцистеин-тиолактона
Интактные крысы	3,81 (3,03; 4,38)	2,92** (2,02; 2,99)	3,90 (3,57; 4,54)	4,24 (3,74; 5,52)	4,48 (3,73; 5,25)
Крысы с ИДС	7,18* (6,61; 7,59)	9,38* ** (7,65; 12,1)	6,20* (4,92; 10,2)	7,50* (6,05; 9,29)	8,67* (6,73; 9,50)

Примечание: \* $p < 0,05$  в сравнении с группой контроля; \*\* $p < 0,05$  в сравнении с уровнем до нагрузки.

Следует обратить внимание на то, что у интактных крыс через 6 часов после введения гомоцистеина отмечается снижение его концентрации в сыворотке крови, сочетающееся с ростом титра аутоантител. При введении же гомоцистеин-тиолактона через 6 часов уровень гомоцистеина практически не изменяется, остается прежним и уровень аутоантител. На наш взгляд, эти данные свидетельствуют о включении в работу иммунных механизмов элиминации высоких доз гомоцистеина, путем развития вторичного иммунного от-

Таблица 2

Содержание аутоантител у крыс (отрицательный десятичный логарифм)  
(Ме (25%; 75%))

Группа	До нагрузки		Через 6 часов после введения				После 9-дневного введения			
	IgG	Все классы	гомоцистеина		гомоцистеинтиолактона		гомоцистеина		гомоцистеинтиолактона	
			IgG	Все классы	IgG	Все классы	IgG	Все классы	IgG	Все классы
Интактные крысы	60 (15; 60)	30 (0; 30)	480** (480; 480)	720** (480; 960)	480** (480; 480)	960** (960; 960)	480** (480; 960)	960** (480; 960)	480 (60; 960)	0 (0; 0)
Крысы с ИДС	30 (30; 60)	0 (0; 0)	60* (60; 60)	30* (30; 30)	60* (60; 60)	30* (30; 30)	30* (0; 60)	15* (0; 30)	60* (0; 60)	0 (0; 30)

Примечание: \* $p<0,05$  в сравнении с группой контроля; \*\* $p<0,05$  в сравнении с уровнем до нагрузки.

Таблица 3

Иммуноограмма крыс (Ме (25%; 75%))

Исследуемые группы		Лимфоциты, %	T %	CD3+ CD4+ %	CD3 CD8 %	T-хелп/ Т-ЦПЛ	CD3%	B %	B
Интактные крысы	До нагр	30,3465 (21,5; 34,875)	44,296 (37,432; 48,8)	60,3 (54,227; 62,434)	36,465 (35,243; 41,875)	1,6485 (1,335; 1,737)	54,561 (50,23; 60,941)	44,569 (31,34; 53,115)	1090 (905; 1617)
	Через 6 ч	26,493 (20,948; 29,558)	43,214 (40,92; 49,261)	60,719 (54,434; 69,38)	36,268 (29,207; 42,604)	1,6765 (1,278; 2,375)	55,912 (50,021; 57,783)	45,998 (37,34; 62,356)	997,5 (743; 1844)
	Через 9 сут	44,685 (31,61; 49,96)	41,1 (38,631; 47,557)	55,041 (48,877; 59,671)	42,3 (39,079; 49,73)	1,29 (0,983; 1,531)	59,8 (52,656; 63,232)	34,788 (31,2; 41,467)	1191 (716; 1501)
Крысы с ИДС	До нагр	26,8005 (19,1235; 33,0285)	78,23* (74,0435; 80,892)	21,092* (15,225; 26,417)	78,421* (72,963; 84,5225)	0,2745* (0,1805; 0,362)	14,885* (10,838; 25,3935)	37,016 (27,69; 53,06)	797,5* (589,5; 887)
	Через 6 ч	11,844* (8,852; 19,575)	72,531* (67,327; 80,781)	31,632* (27,189; 43,77)	67,074* (55,317; 71,505)	0,472* (0,38; 0,791)	18,295* (7,246; 26,626)	30* (26,03; 33,278)	440* (243; 586)
	Через 9 сут	41,7335 (33,974; 46,8305)	81,669* (75,621; 85,2465)	28,777* (23,401; 35,0655)	66,661* (49,5365; 71,9175)	0,407* (0,3085; 0,546)	18,667* (14,425; 23,1995)	8,241* (4,696; 19,039)	81,5* (33; 164,5)

Примечание: \* $P<0,05$  в сравнении с группой контроля.

вета. На фоне 9-ти дневного введения метаболитов происходит возрастание уровня гомоцистеина в сочетании с повышением титра аутоантител, что, вероятно, свидетельствует о превышении компенсаторных возможностей аутоиммунного механизма элиминации.

У крыс с подтвержденным гуморальным иммунодефицитом (табл. 3.) отмечается повышение уровня гомоцистеина в сыворотке крови по сравнению с интактными животными как до, так и после введения метаболитов (табл. 1). Обращает на себя внимание то, что после введения гомоци-

стеина иммунодефектным крысам отмечается возрастание его уровня на фоне неизмененной концентрации аутоантител, что вызвано, по-видимому, отсутствием у данных животных иммунного механизма элиминации токсического метаболита. Уровень гомоцистеина через 9 суток у иммунодефектных крыс возвращается к исходному (донагрузочному) уровню, что, вероятно, связано с включением других, более отсроченных, механизмов его элиминации (реметилирование в метионин и превращение в цистеин).

**Заключение**

У лабораторных животных в ходе эксперимента обнаружено снижение уровня гомоцистеина после его введения на фоне возрастания концентрации аутоантител к модифицированному гомоцистеином альбумину, что свидетельствует о возможности иммунного механизма элиминации этого метаболита. У крыс с гуморальным иммунодефицитом отмечается, напротив, возрастание концентрации гомоцистеина в сыворотке крови после его введения, на фоне общего снижения уровня аутоантител.

**ЛИТЕРАТУРА**

1. Дутов А.А. Определение гомоцистеина и цистеина в плазме/сыворотке крови ВЭЖХ методом с УФ детекцией и твердофазной экстракцией на полимерном сорбенте / А.А. Дутов, Д.А. Никитин, А.А. Федотова // Биомедицинская химия. - 2010. - Т. 56, вып. 5. - С. 609 - 615.
2. Измельцев С.В. Исследование уровня аутоантител к модифицированному сывороточному альбумину и тромбину [Электронный ресурс] / С.В. Измельцев, Е.В. Фефелова, П.П. Терешков, А.А. Дутов, С.И. Михайличенко, Н.Н. Цыбиков // Забайкальский медицинский вестник. - 2012. - №2. - С. 112-115. - Режим доступа: <http://medacadem.chita.ru/zmv>
3. Цыбиков Н.Н. Роль гомоцистеина в патологии человека / Н.Н. Цыбиков, Н.М. Цыбикова // Успехи современной биологии. - 2007. - Т.127, № 5. - С. 471-482.
4. Цыбикова Н.М. Гомоцистеин: роль в патологии человека и методы коррекции / Н.М. Цыбикова, М.Н. Цыбиков // Забайкальский медицинский вестник. - 2006. - № 4. - С. 32-36.
5. Шмелева В.М. Гипергомоцистеинемия в патогенезе тромботических заболеваний / В.М. Шмелева // Трансфузиология. Научно-практический журнал. - 2006. - Т. 7, № 1. - С. 33-47.
6. Antoniades C. Homocysteine and coronary atherosclerosis: from folate fortification to the recent clinical trials / C. Antoniades, A. Antonopoulos, D. Tousoulis // European Heart Journal. - 2009. - Vol. 30. - P. 6-15.
7. Cattaneo M. Hyperhomocysteinemia and venous thromboembolism / M. Cattaneo // Thromb. Haemost. - 2006. - Vol. 32 (7). - P. 716-723.
8. Jakubowski, H. Homocysteine thiolactone: metabolic origin and protein homocysteinylation in humans [Text] / H. Jakubowski // J. Nutr. - 2000. - Vol. 130. - P. 377-381.
9. Jakubowski, H. The pathophysiological hypothesis of homocysteine thiolactone-mediated vascular disease [Text] / H. Jakubowski // J. Physiol. Pharmacol. - 2008. - Vol. 59(9). - P. 155-167.
10. Lentz S. Mechanisms of homocysteine-induced atherothrombosis / S. Lentz // Thromb. Haemost. - 2005. - Vol. 3. - P. 1646 - 1654.
11. Sengupta S. Relative roles of albumin and ceruloplasmin in the formation of homocystine, homocysteine-cysteine-mixed disulfide, and cystinein circulation / S. Sengupta, C. Wehbe, K. Alana // J. Biol. Chem. - 2001. - V. 276. - №50. - P. 46896-46904.
12. Undas A. Folic acid administration and antibodies against homocysteinylated proteins in subjects with hyperhomocysteinemia / A. Undas, E. Stepień, R. Glowacki // Thromb. Haemost. - 2006. - Vol. 96. - P. 342-347.