ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

УДК 616.12-005-02:616-097.3

Изместьев С. В., Фефелова Е. В., Терешков П. П., Дутов А. А. Михайличенко С. И., Цыбиков Н. Н.

ИССЛЕДОВАНИЕ УРОВНЯ АУТОАНТИТЕЛ К МОДИФИЦИРОВАННОМУ СЫВОРОТОЧНОМУ АЛЬБУМИНУ И ТРОМБИНУ

ГБОУ ВПО Читинская государственная медицинская академия, г. Чита

Резюме. Определен уровень аутоантител в сыворотке крови и смешанной слюне к модифицированному гомоцистеином сывороточному альбумину человека и тромбину у больных сердечно-сосудистой патологией. Установлено, что максимальный уровень аутоантител класса IgG и S-IgA был зарегистрирован у больных стабильной и прогрессирующей стенокардией.
Ключевые слова. *Гомоцистеин, атеросклероз, модифицированный альбумин, аутоантитела.*

S. V. Izmestyev, E. V. Fefelova, P. P. Tereshkov, A. A. Dutov, S. I. Mikhaylichenko, N. N. Tsybikov

INVESTIGETION OF LEVEL OF AUTOANTIBODIES AGAINST MODIFICATED SERUM ALBUMIN AND THROMBIN

Summary: Level of autoantibodies against thrombin and human serum albumin modificated by homocysteine in blood and saliva are detected in patient with cardiovascular pathology. Maximum level of class IgG and S-IgA antibodies are registered in patient with stable and progressing angina pectoris.
Key words: *Homocysteine, atherosclerosis, modificated albumin, autoantibodies.*

Введение

Известно, что среди факторов риска атеросклероза немаловажное значение отводится гомоцистеину, который инициирует повреждение эндотелиальных клеток и тем самым запускает процесс образования атеросклеротической бляшки [2, 4, 7]. Более того, согласно многочисленным исследованиям, гомоцистеин является причиной атеротромбоза с последующим развитием фатальных катастроф в различных отделах сосудистой системы [5, 8, 9]. Наряду со сказанным, имеются единичные исследования, свидетельствующие о возможности комплексирования гомоцистеина с белками плазмы крови и особенно с альбумином [10]. Не исключено, что конъюгат гомоцистеин-альбумин способен обладать аутоантигенными свойствами и вызывать образование аутоантител [11]. Сформированные иммунные комплексы могут явиться дополнительным фактором альтерации эндотелия и бляшкообразования. Кроме того, хорошо известно, что гипергомоцистеинемия сопровождается усилением коагуляционного потенциала крови и позитивными тестами генерации тромбина [6]. Тромбин, с одной стороны, способен вызывать тромбообразование, а с другой, явиться причиной образования аутоантител [3]. Вместе с тем, до настоящего времени поставленные вопросы в современной литературе освещены недостаточно, что и составило предмет нашего исследования.

Цель исследования: выявить уровень аутоантител к альбумину, модифицированному гомоцистеином в сыворотке крови и смешанной слюне, а также содержание аутоантител к тромбину в сыворотке крови.

Задачи исследования:

1. Получить конъюгат гомоцистеина с сывороточным альбумином человека (модифицированный альбумин).
2. Оценить содержание аутоантител к модифицированному альбумину в сыворот-

ке крови и смешанной слюне у больных сердечно-сосудистой патологией.

3. Определить содержание аутоантител к тромбину в сыворотке крови.

Материалы и методы

Для получения модифицированного альбумина гомоцистеин ("Fluco", Германия) в концентрации 150 мкмоль/л инкубировали с 5% раствором сывороточного альбумина человека (ФГУП НПО "Микроген", Москва) в течение 24 часов при температуре 4°С и затем 60 минут при 37°С. Полученный образец подвергли ультрафильтрации с порогом разделения по молекулярной массе 50 КДа с целью отделить свободный гомоцистеин от образовавшего связь с альбумином. Ультрафильтрацию проводили с помощью набора для центрифужной микрофильтрации AmiconUltra, 0.5 мл, 50 КДа (Millipore, USA). Ультрацентрифуга Sigma 3-30K, ротор 12100, 15 мин при 14.000 g. Концентрацию гомоцистеина в образцах до фильтрации, после фильтрации и в фильтрате определяли методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с ультрафиолетовой детекцией при 330 нм (колонка Chromolith 100×4,6 мм, элюент ацетонитрил - 0,05 М/ лимонная кислота в соотношении 10/90) [1].

В исследовании приняли участие три группы больных мужского пола. Первая группа с диагнозом ИБС: стабильная стенокардия III ФК (10 человек), диагноз выставлен на основании синдрома хронической коронарной недостаточности. Вторая группа - ИБС: прогрессирующая стенокардия (12 человек), диагноз выставлен на основании отрицательной динамики ангинозного синдрома. Третья группа больных с Q-инфарктом миокарда в острую стадию (10 человек), диагноз выставлен, учитывая синдром ангинозных болей, синдром ЭКГ-изменений. Группа контроля сопоставимая по полу и возрасту (12 человек). Средний возраст исследуемых лиц составил 61,2±9,7 лет. Критериями исключения из исследования служили: острый и хронический пиелонефрит, гломерулонефрит, острая патология желудочно-кишечного тракта, органов дыхания, сахарный диабет, онкозаболевания. У исследуемых осуществляли забор венозной крови системой Vacutainer и смешанной слюны натощак.

Аутоантитела к комплексу гомоцистеин-альбумин и человеческому тромбину (фактор IIa) определяли оригинальным методом. Лунки планшетов для иммунологических исследований сенсибилизировали либо чистым альбумином для исключения возможности неспецифического взаимодействия аутоантител с ним, либо модифицированным альбумином, либо тромбином (Sigma, США) в количестве по 20 мкг на лунку в объеме 200 мкл фосфатного буфера (PBS). После 24 часовой инкубации при температуре 4°С лунки планшетов трижды отмывали фосфатным буфером и вводили по 20 мкг глицина в объеме 200 мкл фосфатного буфера для связывания реактивно способных участков полистирола. Исследуемые образцы сыворотки крови и смешанной слюны разводили 1/200 и 1/100, соответственно, забуференным физиологическим раствором и проводили реакцию ИФА. Детекцию аутоантител осуществляли анти-G-антителами (для образцов сыворотки крови) и анти-S-IgA-антителами (для образцов слюны), меченными пероксидазой хрена ("Вектор-бест", Новосибирск). Уровень антител оценивали по разнице экстинкции между лунками, сенсибилизированными модифицированным альбумином и чистым. Полученный результат выражали в единицах оптической плотности (OD450).

Статистическую обработку полученных данных выполняли в программе STATISTICA с использованием непараметрического критерия Манна-Уитни. Статистически значимыми считались различия при значении $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

В процессе образования модифицированного альбумина получен следующий результат: содержание гомоцистеина в образце до фильтрации составило 189,3 нг/мкл, после фильтрации и десорбции с фильтра - 74,3 нг/мкл, в фильтрате - 120 нг/мкл. Данные отображены на хроматограммах (рис.).

Таким образом, порядка 40% гомоцистеина было задержано в образце при ультрафильтрации за счет образования химический связи с молекулами сывороточного альбумина.

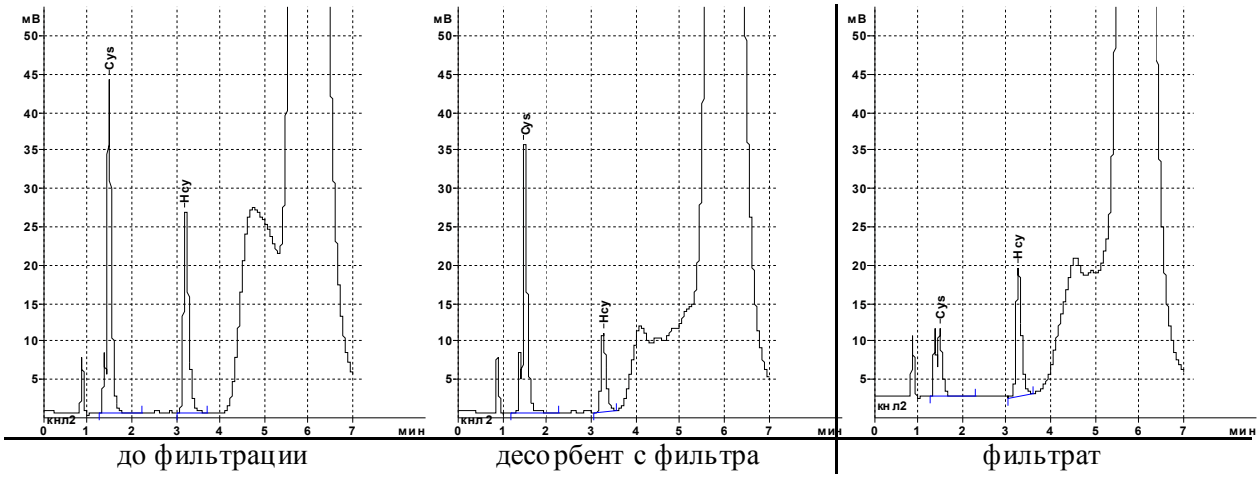

Рис. Хроматограммы исследованных образцов
(Hcy - пик, отражающий концентрацию гомоцистеина).

По результатам проведенного иммуноферментного анализа уровень аутоантител к модифицированному альбумину в сыворотке крови максимален у больных стабильной и прогрессирующей стенокардией. В то же время у таких больных отмечается минимальный уровень аутоантител в слюне в сравнении с группой контроля. Уровень аутоантител к тромбину в сыворотке крови также достоверно выше в группе больных с прогрессирующей стенокардией (табл.).

Таблица

Содержание аутоантител к комплексу гомоцистеин-альбумин и тромбину (Me (25%; 75%)).

Диагноз	Аутоантитела к модифицированному альбумину в сыворотке	Аутоантитела к модифицированному альбумину в смешанной слюне	Аутоантитела к тромбину в сыворотке
Контрольная группа (n=12)	0,026 (0,01; 0,038)	0,014 (0,01; 0,057)	0,055 (0,036; 0,14)
Стабильная стенокардия (n=10)	0,075* (0; 0,076)	0,01 (0; 0,057)	0,081 (0,034; 0,185)
Прогрессирующая стенокардия (n=12)	0,066* (0,039; 0,111)	0,012* (0,001; 0,02)	0,144* (0,079; 0,181)
Инфаркт миокарда (n=10)	0,043 (0,026; 0,049)	0,023* (0,007; 0,038)	0,092 (0,039; 0,278)

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

Как следует из таблицы, в сыворотке крови и смешанной слюне здоровых лиц выявляются аутоантитела к модифицированному альбумину, что указывает на возможность комплексирования гомоцистеина с альбумином в физиологических условиях. Обращает внимание содержание аутоантител к конъюгатам класса IgA в смешанной слюне. Этот факт указывает на интенсивное образование аутоантител в реакции местного иммунитета. Наряду со сказанным, в сыворотке крови доноров выявлены аутоантитела к тромбину. Ранее Н. Н. Цыбиковым [3] было показано, что аутоантитела к тромбину регистрируются в высоком титре в цитратной плазме крови, а в сыворотке их концентрация не определяется или определяется в крайне низких цифрах, что может быть объяснено связыванием аутоантител генерирующимся тромбином в процессе свертывания плазмы.

Следует отметить, что у больных стабильной и прогрессирующей стенокардией возрастает содержание аутоантител к конъюгатам гомоцистеин-альбумин в сыворотке крови, а в слюне снижается. Увеличение уровня аутоантител в сыворотке крови может быть связано с иммунизирующим действием модифицированного альбумина, так как в эту стадию коронарного атеросклероза отмечается высокий уровень гомоцистеина. Снижение же концентрации аутоантител в смешанной слюне, вероятно, обусловлено их связыванием с конъюгатом

с последующим включением в состав иммунных комплексов. У больных с прогрессирующей стенокардией значительно увеличивается содержание аутоантител к тромбину, что возможно является косвенным признаком интенсификации перманентного внутрисосудистого свертывания крови, усилением генерации тромбина и проявлением его иммуногенной активности. Следует полагать, что рост уровня аутоантител к тромбину отражает компенсаторную реакцию системы иммунитета на угрозу фибринообразования.

Заключение. Таким образом, при гипергомоцистеинемии и повышении коагуляционного потенциала крови происходит выработка аутоантител классов IgG и S-IgA к альбумину, модифицированному гомоцистеином и тромбину.

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. Цыбиков Н.Н. Роль гомоцистеина в патологии человека / Н.Н.Цыбиков, Н.М. Цыбикова // Успехи современной биологии. - 2007. - Т.127, № 5. - С. 471-482.
3. Цыбиков Н. Н. Доказательство иммунного механизма регуляции ферментов гемостаза / Н. Н. Цыбиков // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. - 1982. - №5. - С. 8-9.
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. Шмелева В. М. Гипергомоцистеинемия - значимый фактор риска развития артериальных и венозных тромбозов / Шмелева В. М., Капустин С. И., Блинов М. И., Папаян Л. П. // Медицинский академический журнал. - 2003. - Т. 3, №7. - С. 28-34.
7. Antoniades C. Homocysteine and coronary atherosclerosis: from folate fortification to the recent clinical trials / C. Antoniades, A. Antonopoulos, D. Tousoulis, K. Marinou, C. Stefanadis // European Heart Journal. - 2009. - Vol. 30. - P. 6-15.
8. Cattaneo M. Hyperhomocysteinemia and venous thromboembolism / M. Cattaneo // Thromb. Haemost. - 2006. - Vol. 32 (7). - P. 716-723.
9. Lentz S. Mechanisms of homocysteine-induced atherothrombosis / S. Lentz // Thromb. Haemost. - 2005. - Vol. 3. - P. 1646 - 1654.
10. 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 et. al. // J. Biol. Chem. - 2001. - V. 276. - №50. - P. 46896-46904.
11. Undas A. Folic acid administration and antibodies against homocysteinylated proteins in subjects with hyperhomocysteinemia / A. Undas, E. Stepien, R. Glowacki et al. // Thromb. Haemost. - 2006. - Vol. 96. - P. 342-347.