УДК 616—089.843:577

ВИВЧЕННЯ ВОДОРОЗЧИННИХ БІЛКІВ ШКІРИ ПРИ АЛОТРАНСПЛАНТАЦІЇ МЕТОДОМ ДИСК-ЕЛЕКТРОФОРЕЗУ

Ю. Я. Бойко

Відділ патологічної фізіології Київського інституту гематології та переливання крові

Дослідження патогенезу відторгнення потребує глибокого проникнення в інтимні аспекти реакції тканинної несумісності не тільки через вивчення імунологічних показників, але й аналіз особливостей білкового обміну в самому трансплантаті. У зв'язку з цим ми поставили за мету вивчити у щурів з допомогою найбільш сучасного методу електрофорезу в поліакриламідному гелі зміни в білкових фракціях водорозчинних білків шкіри при алотрансплантаціях на перший, третій, п'ятий, дев'ятий дні переживання трансплантату.

Методика досліджень

Відомі підтримуючі середовища (папір, агар, крохмаль) мають безліч недоліків, одним з яких є їх мала розв'язувальна здатність. Поліакриламідний гель має певні переваги над цими середовищами. Йому властива висока розв'язувальна здатність і він придатний як для розділення білкових зразків, так і для проведення імуноелектрофорезу [4, 5, 6, 7, 8, 9].

Можна легко створити, змінюючи концентрацію акриламіду, потрібні розміри капілярів у ньому [2, 4, 9, 10, 13, 17]. Найчастіше використовують поліакриламідні гелі з концентрацією акриламіду 7,5—8, 15, 20—30%. Ми користувались 8%-ним гелем.

Досліди проведені на апараті, запропонованому В. Назаренком [3]. Оскільки апарат ще мало відомий, ми вирішили дати його повний опис (рис. 1). Цей апарат складається з двох склянок для буферного розчину, нижньої — 2, верхньої — *3*. Нижньою посудиною може служити хімічна склянка. Верхня посудина зроблена з органічного скла. Дно верхньої посудини має один центральний отвір, через який проходить скляна трубка 7, яка несе на собі платинові електроди, і п'ять бокових отворів, розташованих на однаковій відстані від центра, в які вставляються електрофоретичні трубки. В цьому апараті електрофоретичні трубки виточені з органічного скла і являють собою циліндри (*4*), в які вставлено стержень (*5*). Циліндр і стержень повинні бути

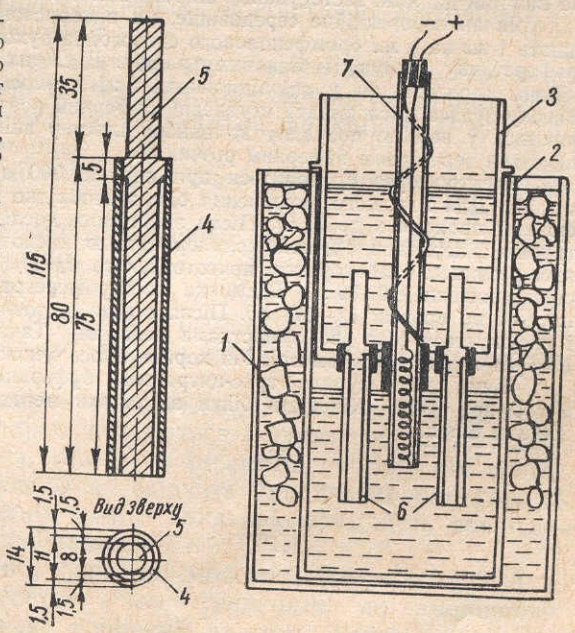

Рис. 1. Електрофоретичний апарат (пояснення в тексті).

добре відшліфовані. Підготовка електрофоретичних трубок до роботи слідуюча: стержень *5* вставляється в циліндр *4* і центрується невеличкими смужками, вирізаними з хлорвінілової пробки. Нижня частина зібраної трубки заклеюється липким пластиром і для герметичності заплавлюється парафіном. Суміш полімера заливається через шліфи, зроблені у верхній частині стержня (на рис. 1, зліва, внизу наведений його вигляд зверху). Полімеризація здійснюється у просторі між стержнем і стінкою циліндра. Електрофоретичні трубки вставляють в отвори посудини (*3*) через гумові муфти, так щоб верхня посудина була герметична. Верхня і нижня посудини заповнюються перехідним буферним розчином. В нижню посудину опускається магніт, зібраний апарат опускають в таючий лід і ставлять на магнітну мішалку. Це забезпечує змішування буферного розчину і охолодження електрофоретичних трубок. Апарат підключають до випрямляча УІП-1.

Приготування геля

Спочатку готують буферні розчини: а) буферний розчин для геля: 0,12 *М* трис-цитратний, pH — 8,65, іонна сила — 0,24; б) перехідний буферний розчин: 0,8 *М* боратний, pH — 8,45, іонна сила — 0,024.

Розчин для приготування геля

Розчин *А* — амід акрилової кислоти 4 *г*; метилен-біс-акриламід 200 *мг*; трис-цитратний буферний розчин до 20 *мл*.

Розчин *В* — темед 0,027 *мл;* трис-цитратний буферний розчин до 5 *мл*.

Розчин *С* — надсернокислий амоній 20 *мг;* трис-цитратний буферний розчин до 10 *мл*. (Розчин *С* використовувати тільки свіжий.)

В нашому дослідженні ми користувались методами, запропонованими Орнстейном і Девісом (лужне середовище) [16], Остером (кисле середовище) [12], але результати розділення білків шкіри були незадовільні, у зв'язку з чим ми підібрали буферні розчини, найбільш оптимальні, на наш погляд, для електрофоретичного розділення водорозчинних білків шкіри. Ці розчини можуть бути запропоновані і при розділенні інших тканинних білків.

Запасні розчини змішуються в таких кількостях: 6 *мл* розчину *А* + 1,5 *мл* розчину *В* + 7,5 *мл* розчину *С*. Після розмішування суміш вноситься в електрофоретичні трубки. Поверх цього розчину наслоюється вода. Електрофоретичні трубки ставляться вертикально в термостат, полімеризація настає через 5—7 *хв*. Перед початком роботи вода з трубки видаляється фільтрувальним папером.

Широко-капілярного гелю ми не застосовуємо, оскільки заздалегідь згущаємо свій матеріал і вносимо на дослід в кількості, яка не перевищує 0,1—0,12 *мл*, що потребує, за нашими даними, застосування широко-капілярного гелю.

Як антиконвекційне середовище, ми використовуємо 20%-ну сахарозу, в яку додають 1 *мг* на 5 *мл* бромфенолового синього, за рухом якого можна обчислювати електрофоретичну рухливість білкових фракцій. Дослідний зразок змішується з антиконвекційним середовищем у співвідношенні 3 : 1 і вноситься в електрофоретичну трубку. Зверху зразка наслоюється студневий буферний розчин до кінця трубки. Трубки вставляються у верхню посудину *2*, липкий пластир знімається, а посудини *2* і *3* заповнюються перехідним буферним розчином.

Електрофорез проводиться при напрузі 300 *в* і силі струму 10 *ма* на кожну трубку. Для хорошого розділення білків необхідно 60 *хв*. За цей час найбільш рухомі фракції проходять до 6 *см*. Після закінчення досліду апарат розбирається і студневі трубки фіксуються 5%-ною трихлороцтовою кислотою. Фореграми фарбуються 0,2%-ним розчином амідочорного, приготовленого на суміші метанол-вода-оцтова кислота у співвідношенні 10 : 30 : 2. Відмивка електрофореграм проводиться у 8%-ній оцтовій кислоті на протязі 12—17 *год*. Після відмивки електрофореграма розрізається вздовж і висушується між двома листками целофану. Така фореграма може бути оброблена на будь-якому денситометрі. Ми користуємось денситометром марки ERI-10 (НДР).

Білки екстрагували трис-цитратним буферним розчином pH—8,65 на протязі 2 *год* при +4°С. Кількість білка визначали методом Лоурі [15]. На пробу вносили 200 *мкг* білка.

Результати д

З допомогою електрофо
дено дослідження водорозчи
Досліди показують, що водо
фракцій (рис. 2). На рисунк
розчинних білків нормально
фракцій та їх електрофоре
вість інтактної шкіри та піс
наведені в таблиці.

Досліди з пересадкою
дено на безпородних білих
нослойний шкірний лоску
1,5×2,5 *см* пересаджували
зунам і фіксували цільним
швом; пересаджений ало
переживав дев'ять—десять

З даних таблиці видно,
бу після пересадки шкіри
ликою електрофоретичною

Рис. 2. Електрофореграма і денси
чинних білків інтактної

(№ 1, 2, 3) — зменшуються
статистично достовірні). З
велика фракція водорозчин
вість цієї фракції дуже бл
бумінової фракції білків
електрофоретичною рухливі
порівнянні з інтактною шкі

Фракції № 11, 13 не змі

На третю добу після т
у водорозчинних білках шк
3, а фракція № 1 — зменш
(статистичні показники дос

Середня величина фра
ний показник не достовірни

На п'яту добу після п
В 80% випадків зникають
зменшується, різко зростає
36% у трансплантованій. А
40—42%. Зменшується фра
вірні).

Змінюється електрофо
10, 11; 12, 13. Ці фракції
Фон фореграми забарвлює
Фракції інтенсивно фарбу
[2], які були відсутні в ін
ться і на дев'яту добу після

Перед відторгненням
7, 8. Фракція № 5 уже не
Електрофореграма стає не

Результати досліджень та їх обговорення

З допомогою електрофорезу в поліакриламідному гелі нами проведено дослідження водорозчинних білків інтактної шкіри від 20 щурів. Досліди показують, що водорозчинні білки шкіри розділяються на 14 фракцій (рис. 2). На рисунку наведена фореграма і денситограма водорозчинних білків нормальної шкіри щурів. Процентні співвідношення фракцій та їх електрофоретична рухливість інтактної шкіри та після пересадки наведені в таблиці.

Досліди з пересадкою шкіри проведено на безпородних білих щурах. Повношаровий шкірний лоскут, розміром 1,5×2,5 *см* пересаджували на спину гризунам і фіксували цільним капроновим швом; пересаджений алотрансплантат переживав дев'ять—десять днів.

З даних таблиці видно, що через добу після пересадки шкіри фракції з великою електрофоретичною рухливістю

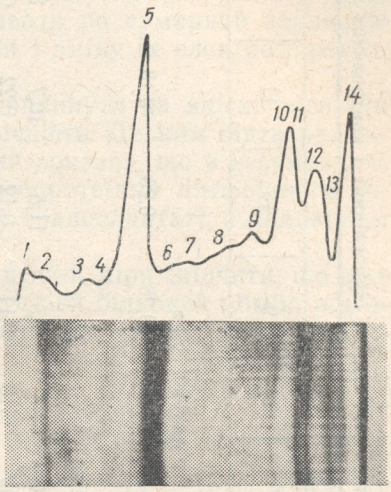

Рис. 2. Електрофореграма і денситограма водорозчинних білків інтактної шкіри.

(№ 1, 2, 3) — зменшуються в середньому десь наполовину (результати статистично достовірні). Зменшується також і фракція № 5, найбільш велика фракція водорозчинних білків шкіри. Електрофоретична рухливість цієї фракції дуже близька до електрофоретичної рухливості альбумінової фракції білків сироватки крові щурів. Фракції з малою електрофоретичною рухливістю № 7, 8, 10, 12 не набагато зростають у порівнянні з інтактною шкірою (показники статистично достовірні).

Фракції № 11, 13 не змінюються.

На третю добу після трансплантації настають більш видимі зміни у водорозчинних білках шкіри. В 70% випадків зникають фракції № 2, 3, а фракція № 1 — зменшується. Збільшуються фракції № 7, 9, 12, 13 (статистичні показники достовірні).

Середня величина фракції № 5 хоч збільшується, проте статистичний показник не достовірний.

На п'яту добу після пересадки настають ще більш видимі зміни. В 80% випадків зникають фракції № 2, 3, 4. Фракція № 1 ще більше зменшується, різко зростає фракція № 5, з 26% в інтактній шкірі до 36% у трансплантованій. А в окремих випадках вона збільшується до 40—42%. Зменшується фракція № 14 з 11,7 до 10,7% (показники достовірні).

Змінюється електрофоретична рухливість таких фракцій № 6, 7; 10, 11; 12, 13. Ці фракції попарно зливаються і йдуть трьома смугами. Фон фореграми забарвлюється, тоді як в інтактній шкірі він ясний. Фракції інтенсивно фарбуються, а це свідчить про невиявлені фракції [2], які були відсутні в інтактній шкірі. Така закономірність зберігається і на дев'яту добу після трансплантації.

Перед відторгненням в 70% випадків зникають фракції № 2, 3, 4, 7, 8. Фракція № 5 уже не зростає, а має тенденцію до зменшення. Електрофореграма стає нечіткою, а фракції розмиті. Зміни, які відзна-

Електрофоретична рухливість і процентне співвідношення водорозчинних білків шкіри піддослідних і контрольних щурів

День після операції	n	Статистичні показники	№ фракції 1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
			Електрофоретична рухливість													
			0,96	0,90	0,80	0,70	0,64	0,56	0,48	0,34	0,28	0,20	0,18	0,12	0,08	0,02
			Інтактна шкіра													
	20	*M*	2,5	2,4	3,3	1,3	26,3	2,8	2,4	1,3	7,5	11,5	10,7	8,3	8,0	11,7
		± *m*	0,001	0,001	0,14	0,06	0,16	0,15	0,01	0,13	0,11	0,12	0,22	0,16	0,27	0,12
			Після пересадки													
1	20	*M*	1,4	1,6	1,8	1,1	25,3	3,2	2,9	3,2	8,3	10,3	10,6	9,9	8,5	11,9
		± *m*	0,11	0,12	0,25	0,14	0,27	0,24	0,22	0,06	0,25	0,15	0,24	0,1	0,37	0,15
		p	<0,001	<0,001	<0,001	>0,1	>0,01	>0,05	<0,05	<0,16	<0,01	<0,01	>0,5	<0,001	>0,5	>0,2
3	14	*M*	1,2			1,5	27,7	3,1	3,0	1,9	8,0	10,2	10,5	11,2	11,1	10,6
		± *m*	0,1	—	—	0,12	0,32	0,19	0,13	0,1	0,18	0,17	0,5	0,19	0,03	0,13
		p	<0,001			>0,1	>0,2	>0,2	<0,001	>0,05	>0,001	<0,001	>0,5	<0,001	<0,02	<0,01
5	20	*M*	0,9				36,1	3,6			5,4	17,6*		27,0*		87
		± *m*	0,06	—	—	—	0,48	0,17			0,024	0,8		0,26		0,31
		p	<0,001				<0,001	<0,001			<0,001					<0,001
9	16	*M*	0,6				35,5	3,2			8,0	17,0*		27,3*		7,7
		± *m*	0,05	—	—	—	0,1	0,36	—	—	0,27	0,29		0,4		0,02
		p	<0,001				<0,001	<0,02			>0,05					<0,001

* Для фракцій із зміненою електрофоретичною рухливістю *p* не виведено.

чаються до п'ятого дня, на наш погляд, пов'язані з неспецифічними факторами впливу організму на трансплантат: травма після пересадки, запалення, тощо. При цьому чітко збільшується кількість протеолітичних ферментів, які розщеплюють білки, змінюючи тим самим їх електрофоретичну рухливість і процентне співвідношення.

З п'ятого дня після пересадки включаються додаткові специфічні фактори, серед яких слід вказати на значення реакції антиген-антитіло, яка проходить на клітині, зменшуючи тим самим її заряд [11, 14]. А це деякою мірою, на наш погляд, може впливати на сумарний заряд водорозчинних білків трансплантованої шкіри і зміну їх електрофоретичної рухливості.

Всі ці кількісні зміни не можуть не вплинути на якісні аспекти структури білків та на їх антигенну специфічність. Деяким підтвердженням цього є дослідження Антоненка [1], який показав, що в несумісності тканин вагоме місце треба віддавати нуклеопротеїнам лімфоїдного походження, які впливають на синтез білків у трансплантаті, з надбанням цими білками нових антигенних якостей.

Отже, одержані результати можуть до деякої міри свідчити, що вже в ранні строки після трансплантації порушується білковий обмін, пов'язаний як з специфічними, так і з неспецифічними травмуючими факторами.

Література

1. Антоненко В. И.— В кн.: Трансплантация органов и тканей, Горький, 1970, 31.
2. Гофман Ю. Я.— Биохимия, 1965, 30, 6, 1160.
3. Назаренко В. И., Лишко В. К., Кудинов С. А.— Лабор. дело, 1971, 5, 309.
4. Сафонов В. И., Сафонова М. П.— Физиол. растений, 1964, 11, 6, 1105.
5. Тихонов В. П.— Лабор. дело, 1969, 11, 665.
6. Хавкин Ю. А., Акатова Э. Н.— Лабор. дело, 1969, 7, 411.
7. Хавкин Ю. А.— Лабор. дело, 1969, 8, 503.
8. Шляховенко В. А., Смирнова И. А.— Лабор. дело, 1970, 5, 311.
9. Antoine B.— Science, 1962, 148, 977.
10. Baumgarten A.— Nature, 1963, 199, 490.
11. Bert G., Cossano D., Pecco P.— Clin. Exp. Immunol., 1969, 5, 669.
12. Esther M.— Analit. Biochem., 1969, 27, 2, 205.
13. Feuer H., Lynch U.— J. Am. chem. Soc., 1953, 75, 5028.
14. Jonus E.— Biochem. J., 1967, 104, 78.
15. Lowry O. et al.— J. Biol. chem., 1951, 193, 265.
16. Ornstein L., Davies B.— Ind. N. Y., 1962.
17. Poulik M.— Nature, 1957, 180, 1474.

Надійшла до редакції
26.IV 1971 р.

STUDY OF SKIN WATER-SOLUBLE PROTEINS DURING ALLOTRANSPLANTATION BY MEANS OF DISK-ELECTROPHORESIS

Yu. Ya. Boiko
Institute of Hematology and Blood Transfusion

Summary

Investigations were carried out of skin water-soluble proteins in different periods of its survival in the recipient bed. By means of disk-electrophoresis in polyacrylamide gel it is shown that water-soluble proteins of intact skin are subdivided into 14 fractions. During transplantation skin was studied on the first, third, fifth, nineth day after transplantation.

An assumption is advanced that the changes established are primarily connected with non-specific mechanisms of the tearing away process. Beginning from the 5th day additional immunological factors determined by the reaction of tissue incompatibility are involved into the process.