

*І.М. Трахтенберг, академік АМНУ, член-кор. НАНУ¹,
Т.Ю. Громовий к.хім.н.², В.О. Покровський, д. фарм. н.²,
Н.М. Дмитруха, к.б.н.¹, Г.В. Шевченко¹*

ДОСЛІДЖЕННЯ ВПЛИВУ СВИНЦЮ І КАДМІЮ НА ІМУНОГЛОБУЛІН G ЛЮДИНИ ЗА ДАНИМИ MALDI-TOF МАС-СПЕКТРОМЕТРІЇ

¹ — ДУ "Інститут медицини праці" АМН України, м. Київ

² — Інститут хімії поверхні ім. О.О.Чуйка НАН України, м. Київ

Важкі метали, свинець і кадмій, відносяться до небезпечних забруднювачів довкілля, які негативно впливають на здоров'я людини [1, 2]. Тривалий контакт з даними металами та їх надходження в організм, навіть у малих концентраціях, призводить до пригнічення імунітету, зниження опору інфекціям, розвитку алергічної, автоімунної та онкологічної патології [3,4]. З літератури [5-7] відомо, що свинець і кадмій справляють токсичну дію на імунну систему організму, проте механізми імунотоксичності до кінця не з'ясовані. Відомо, що свинець і кадмій відносяться до високоокисних отрут, які здатні блокувати реактивні (сульфгідрильні, карбоксильні та фосфатні) групи біополімерів, у тому числі білків, нуклеїнових кислот, ферментів [8]. При надходженні в організм метали приєднуються до білків сироватки крові (альбумін, трансферин, лактоферин), які мають особливе значення в їх транспортуванні, елімінації та механізми токсичної дії [8]. За даними авторів роботи [9], до білків плазми крові, які здатні приєднувати і транспортувати катіони металів, відносяться також імуноглобуліни (Ig). Імуноглобуліни представлені п'ятьма класами (G, M, A, D і E), серед яких Ig G складають 75% від загальної кількості. Важливою властивістю IgG є вища порівняно з IgM активність щодо більшості хімічних речовин, які є гаптенами. Як антитіла Ig виконують антигензв'язуючу та ефektorну функцію, що спрямовані на елімінацію чужорідного антигену з організму [10,11].

За будовою імуноглобуліни класу G — це глікопротеїни з молекулярною масою ~150 кДа, що мають в основі чотирихланцюгову мономерну структуру і складаються з двох ідентичних важких (H) та двох ідентичних легких (L) ланцюгів, які з'єднані дисульфідними зв'язками (рис.1). Легкий ланцюг має молекулярну масу 20-25 кДа і сформований з двох доменів — одного варіабельного (VL) і одного константного (CL). Важкий ланцюг має молекулярну масу 50-55 кДа і складається з одного варіабельного (VH) і трьох константних доменів (CH1, CH2, CH3). Між доменами CH1 та CH2 знаходиться так звана шарнірна область, яка забезпечує гнучкість молекули IgG [11].

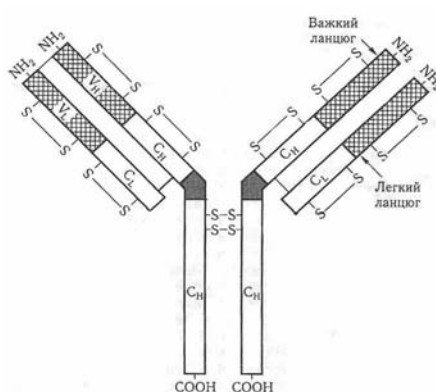


Рис.1. Схематичне зображення молекули IgG [11]

Враховуючи структурні особливості будови молекули IgG, а також те, що свинець і кадмій є тіоловими отрутами, можна припустити, що дані метали будуть взаємодіяти з сульфгідрильними групами даного білка і, таким чином, впливати на його функцію.

Метою роботи було дослідження впливу ацетату свинцю і сульфату кадмію на імуноглобулін сироватки крові людини в модельних умовах *in vitro* за допомогою методу MALDI-ToF мас-спектрометрії. Завдяки своїй інформативності, точності та високій продуктивності MALDI-ToF (Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization Time of Flight) мас-спектрометрія є одним із сучасних методів дослідження високомолекулярних біологічних сполук, включаючи протеїни, нуклеїнові кислоти, ліпіди, олігосахариди [12]. Метод базується на матрично активованій лазерній десорбційній іонізації з часо-перельотним аналізатором. Можливість ідентифікувати протеїни за допомогою MALDI-ToF мас-спектрометрії зумовила розвиток протеоміки і нині використовується як один з головних її інструментів. Вона також успішно застосовується для дослідження білок-білкових взаємодій, секвенування та вивчення модифікацій протеїнів та нуклеїнових кислот [13].

Матеріали і методи дослідження

Для досліджень в даній роботі використовували препарат -імуноглобулін людини нормальний (виробник "Біотек", Харків), та солі металів: ацетат свинцю і сульфат кадмію (хч, ГОСТ 4456-75). Мас-спектри імуноглобуліну вимірювали на приладі Autoflex II — (Bruker). Дослідження проведені із застосуванням матриці сінапової кислоти [Sinapic Acid (SA), Fluka]. Аналізу піддавали сумарні спектри позитивних іонів, які одержували шляхом накопичення 600 одинарних спектрів.

Приготування розчину імуноглобуліну та солей металів.

Препарат імуноглобуліну розводили деіонізованою водою у співвідношенні 1:100. Розчини (0,01M; 0,001M) ацетату свинцю та сульфату кадмію готували розчиненням відповідних наважок солей у деіонізованій воді. До 0,1 мл розведеного імуноглобуліну додавали 0,1 мл розчину солі металу, інкубували 2 год при кімнатній температурі й потім змішували з матрицею SA. В якості контролю був використаний розведений імуноглобулін.

Приготування матриці SA

Матрицю SA готували наступним чином: 12 мг SA розчиняли в 1

мл суміші вода-ацетонітрил 1:1, потім розчин інкубували 10 хв за температури 30°C в ультразвуковій бані до повного розчинення кислоти [14]. Матрицю змішували з аналітом (імуноглобулін + солі металів) у співвідношенні 1:1 та наносили на стандартну сталеву підкладку. Після співкристалізації матриці з аналітом підкладку розміщували в робочій зоні мас-спектрометра. Дослідження проводили у масовому діапазоні 19-300 кДа.

Результати та їх обговорення

За результатами досліджень мас-спектр препарату імуноглобуліну людини складався з декількох піків: ~ 148 кДа, що відповідає молекулярному іону молекули IgG; ~125 кДа, що відповідає молекулі IgG без одного легкого ланцюга; ~100 кДа, який можна розглядати як масу молекули IgG, що втратила два легких ланцюга. А також піки з меншими масами: ~ 74 кДа, що відповідає з'єднанням Н- і L-ланцюгам, та ~ 47 кДа - важкому і ~23кДа — легкому

ланцюгам. Слід відзначити, що отриманий мас-спектр нормального імуноглобуліну людини та його інтерпретація збігається з даними інших авторів [12,14]. Після інкубації імуноглобуліну з розчином ацетату свинцю у концентрації 10^{-3} М зміни мас відповідних піків у позитивному мас-спектрі не спостерігались у порівнянні з контролем. При збільшенні концентрації ацетату свинцю на порядок до 10^{-2} М виявлялось підвищення масового значення молекулярного іону імуноглобуліну та фрагменту, який відповідає молекулі IgG без легкого ланцюга, на молекулярну масу одного атому свинцю. Фрагмент молекули IgG, що за мас-спектром втратив два легких ланцюга, збільшив свою масу на два атоми свинцю (табл. 1).

Аналогічна інкубація імуноглобуліну людини з розчином сульфату кадмію викликала більш виразні зміни у його мас-спектрі. Приєднання іонів металу до фраг-

ментів імуноглобуліну відбувалось вже при концентрації сульфату кадмію 10^{-3} М. Найбільш активне приєднання кадмію (5 атомів) відбувалось до фрагменту IgG з масою близько 125 кДа. Два атоми кадмію приєднувались до цільної молекули імуноглобуліну та до його НL комплексу, один атом металу — до важкого ланцюга IgG. При підвищенні експозиційної концентрації сульфату кадмію до 10^{-2} М виявлялось суттєве збільшення масового значення імуноглобуліну людини, як цілої молекули, так і її фрагментів, окрім легкого ланцюга.

Інкубація імуноглобуліну людини з розчинами оцтової та сірчаної кислот у відповідних концентраціях (0,01 М; 0,001 М) не призводила до значущих змін у його мас-спектрах.

Таким чином, отримані результати дозволяють припустити, що атоми кадмію більш активно приєднувались до молекули IgG та його фрагментів, ніж атоми свинцю. Сvineць приєднувався головним чином до фрагментів імуноглобуліну з більшою молекулярною масою, тоді як атоми кадмію взаємодіяли практично з усіма фрагментами досліджуваного білка (рис. 2а, б).

Наявність різних піків в мас-спектрах контрольного і дослідних зразків дозволяє припустити, що утворення фрагментів молекули імуноглобуліну з різною масою теоретично може відбуватися двома шляхами (рис.3). Перший — поділом молекули IgG навпіл з утворенням фрагментів масою близько 75 кДа з подальшою їх фрагментацією на важкі та легкі ланцюги. Якщо у досліджуваній системі відбувався такий напрямок фрагментації, то на отриманих мас-спектрах ми б спостерігали наявність піків близько 150 кДа, 75 кДа, 50 кДа та 25 кДа, відповідно. Другий — полягає у тому, що спочатку від молекули IgG відокремлюється легкий ланцюг, а у подальшому може бути втрачено ще один легкий або важкий ланцюги. У цьому випадку на мас-спектрі можна спостерігати маси, що дорівнюють близько 150 кДа, 125 кДа, 100 кДа, 75 кДа, 50 кДа та 25 кДа.

Аналіз отриманих мас-спектрів IgG людини показав, що більш вірогідним є саме другий шлях фрагментації. Підтвердженням даного припущення є наявність у спектрі

Таблиця 1
Масові значення фрагментів імуноглобуліну IgG до та після інкубації з ацетатом свинцю та сульфатом кадмію

Дослідна проба/ кількість приєднаних атомів металу	Масові значення фрагментів імуноглобуліну, кДа					
IgG (контроль)	147910	124686	100700	73882	47090	23273
IgG+Pb 10 -3M	147900	124675	100775	73924	47110	23278
Pb	0	0	0	0	0	0
IgG+Pb 10-2M	148123	125000	101108	74000	47177	23297
Pb	1	1	2	0	0	0
IgG+ Cd 10 -3M	148147	125297	100726	74101	47204	23273
Cd	2	2	0	2	1	0
IgG+ Cd 10-2M	149051	125964	100823	74605	47351	23256
Cd	10	11	1	6	2	0

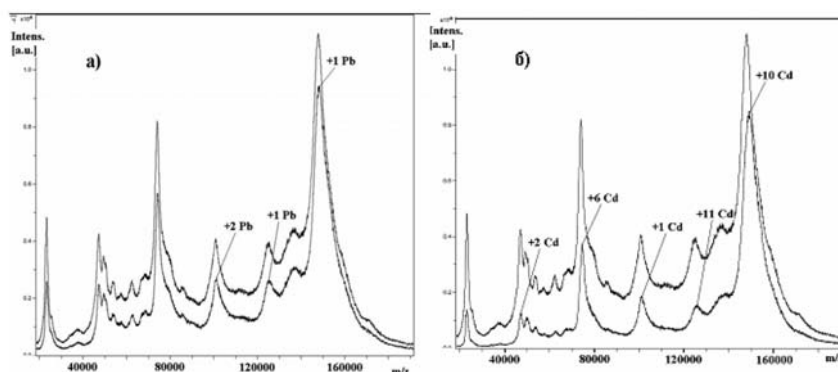


Рис.2. Мас-спектри імуноглобуліну людини
а) контроль (верхній спектр) та після 2-х год експозиції з 0,01 М розчином ацетату свинцю (нижній спектр);
б) контроль (верхній спектр) та після 2-х год експозиції з 0,01 М розчином сульфату кадмію (нижній спектр)

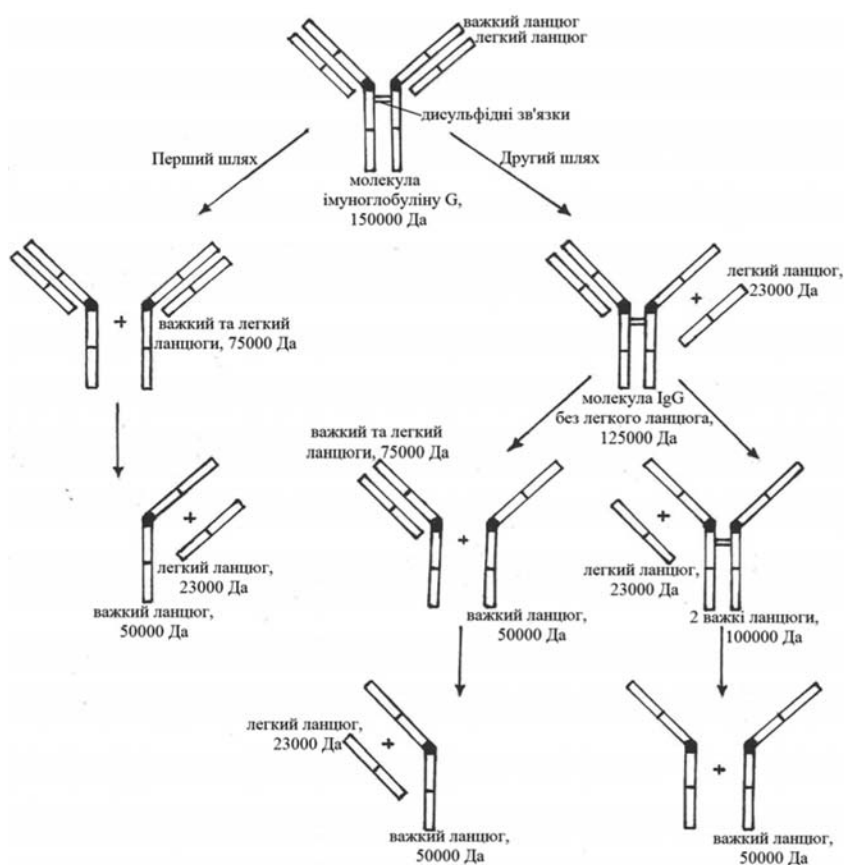


Рис.3. Схема фрагментації молекули імуноглобуліну G за даними MALDI-ToF мас-спектрометрії

досліджуваного імуноглобуліну піків масою 125 кДа та 100 кДа. Проте не слід виключати, що перший шлях також може мати місце. Співставлення мас-спектрів контрольних і дослідних проб імуноглобуліну людини дозволяє констатувати, що інкубація його з розчинами солей свинцю та кадмію в умовах *in vitro* призводила до пригнічення інтенсивності піків та змін у їх співвідношеннях (табл. 2).

Якщо порівняти відношення інтенсивності піків, зокрема, масою 150 кДа до 125 кДа, то можна припустити, що наявність металів в дослідній пробі у порівнянні з деіонізованою водою в контролі приводить до зменшення фрагментації імуноглобуліну, тобто стабілізації молекули. Свідченням стабілізації або зміцнення зв'язків між важким та легким ланцюгами імуноглобуліну є збільшення вели-

чини відношення піків, що відповідають масам 150 кДа до 25 кДа та 75 кДа до 25 кДа. З даних, представлених в таблиці 2 слідує, що більшу активність у стабілізації молекули IgG виявляли іони кадмію. Результати дослідження дозволяють припустити, що ефект стабілізації молекули IgG за рахунок приєднання іонів металів (особливо у варіабільній частині) може впливати на функціональну активність імуноглобуліну, а саме на його реактивність до утворення комплексів Ag-Ag.

Паралельні дослідження імуноглобуліну людини (нативного і після інкубації з солями металів) в реакції радіальної імунодифузії Манчестера показали, що діаметр кільця преципітації після інкубації з ацетатом свинцю майже не змінювався, а з сульфатом кадмію зменшувався при збільшенні концентрації металу у розчині. Отже, ці дані можуть свідчити про те, що конформаційні зміни IgG, які виникають при взаємодії з солями металів, можуть впливати на розміщення антигенних детермінант на поверхні глобули та їх доступність для розпізнавання і зв'язування специфічними антигенами.

В наших попередніх роботах показано, що отруєння тварин ацетатом свинцю підвищувало вміст циркулюючих імунних комплексів в сироватці крові, а сульфатом кадмію — навпаки знижувало їх рівень [15, 16]. Тобто дані метали виявляли протилежний ефект на формування імунних комплексів. З літератури [17] відомо, що зменшення формування імунних комплексів відбувається за рахунок впливу кадмію на гідродинамічні властивості антитіл. Досліджено, що експозиція свинцем та кадмієм у працюючих викликала зменшення кількості CD4+ (Т-хелперів) та рівня специфічних антитіл (IgG і IgM), підвищуючи сприйнятливості їх організму до різних інфекційних хвороб [18-20]. У осіб, які були експоновані свинцем і кадмієм після щеплення до дифтерії та правцю, визначались низькі титри захисних антитіл [21].

Таким чином, наведені дані літератури та власних досліджень свідчать про порушення формування гуморальної імунної відповіді під впливом важких металів — свинцю і кадмію.

Таблиця 2
Співвідношення величин інтенсивності піків у мас-спектрах IgG після інкубації з 0,01 М розчином ацетату свинцю та сульфату кадмію

Досліджу-вана проба	Співвідношення величин інтенсивності піків з відповідними масовими значеннями					
	150 кДа : 125 кДа	150 кДа : 100 кДа	150 кДа : 75 кДа	150 кДа : 25 кДа	150 кДа : 50 кДа	75 кДа : 25 кДа
IgG контроль	4,4	3,4	2,4	1,3	1,5	0,6
IgG + Pb	6	4,9	2,4	5,3	5,6	2,2
IgG + Cd	6,5	6,1	2,7	10,2	15,9	3,7

Висновки:

1. Отримані мас-спектри імуноглобуліну людини дозволяють констатувати, що свинець і кадмій здатні приєднуватися до молекули IgG та впливати на процеси іоноформування в системі "імуноглобулін-солі металів".
2. Атоми кадмію виявили більшу активність до імуноглобуліну людини, ніж атоми свинцю, що може свідчити про більшу спорідненість останніх до сульфгідрильних груп білка.
3. Атоми кадмію проявляли також більшу активність у стабілізації молекули IgG, що може впливати на його функцію і здатність до утворення імунних комплексів.
4. Конфірмаційні зміни молекули імуноглобуліну за дії свинцю і кадмію можуть впливати на формування гуморального імунітету, зокрема на утворення імунних комплексів АГ-АТ.

ЛІТЕРАТУРА

1. Трахтенберг И.М. Тяжелые металлы как химические загрязнители производственной и окружающей среды // Доклады та здоров'я. — 1997. — №2. — С.48-51.
2. Сердюк А.М. Навколишнє середовище і здоров'я населення України // Там же. — 1998. — № 4 (7). — С.2-6.
3. Сердюк А.М. Вплив чинників навколишнього середовища міст України на формування імунного статусу дитячого населення // Там же. — 2000. — №3 (14). — С.2-5.
4. Паранько Н.М., Белицкая Э.Н., Карнаух., Рублевская Н.И., Ситало С.Г. Тяжелые металлы внешней среды и их влияние на иммунный статус населения.- Днепропетровск: "Полиграфист". — 2002. — 143 с.
5. Koller L.D. Immunotoxicology of heavy metals. // Int.J. Immunopharm. — 1980. — № 2. — P.269-279.
6. Immunotoxicity of metals and immunotoxicology / Ed. A.D. Dayan et al., Plenum Press. — New York. - 1990. — 317 p.
7. Descotes J. Immunotoxicology of cadmium // IARC Scin. Publ. — 1992. — V. 118. — P. 385-390.
8. Общая токсикология / Под ред. Курляндского Б.А., Филова В.А. — М.: "Медицина", 2002. — 608 с.
9. Чекнев С.Б., Бабаева Е.Е., Денисова Е.А., Воробьева У.А., Монгуш Э.М. Антигенная специфичность образцов человеческого сывороточного γ -глобулина, полученных в условиях эквимолярного связывания катионов меди и цинка // Бюл. эксприм. биологии и медицины. — 2007. — Т.143, № 2. — С.170-173.
10. Рот А., Брюсстофф Дж., Бейл Д. Иммунология — М.: Мир. — 2000. — 321 с.
11. Вершигора А.Ю., Пастер Є.У., Колобо Д.В. та ін. Імунологія: Підручник. К.: Вища школа, 2005. — 599 с.
12. Glen L. Hortin The MALDI TOF Mass Spectrometric View of the Plasma Proteome and Peptidome // Clin. Chem. — 2006. — V. 57, N 22. — P. 1-11.
13. Лебедев А.Т. Масс-спектрометрия в органической химии. М. БИОНОМ. Лаборатория знаний, 2003.- 493 с.
14. High Mass Linear Analysis of Intact Proteins on the 4800 MALDI TOF/TOF Analyzer /Technical Note www.appliedbiosystems.com
15. Стежка В.А., Дмитруха Н.Н., Покровская Т.Н., Билько Т.А., Лампека Е.Г. К вопросу об иммунотоксическом действии соединений тяжелых металлов // Совр. пробл. токсикол. — 2003. — №1. — С. 22-28.
16. Дмитруха Н.М. Експериментальне дослідження впливу важких металів (свинцю і кадмію) на неспецифічну резистентність організму білих щурів // Там же. — 2004. — №4. — С. 27-31.
17. Bauer R., Muller A., Richter M., Schneider K., Frey J., Engelhardt W. Influence of heavy metal ions on antibodies and immune complexes investigated by dynamic light scattering and enzyme-linked immunosorbent assay // Biochim. Biophys. Acta. General Subjects. — 1997. — V. 1334, №1. — P. 98-108.
18. Kimber I, Jackson JA, Stonard MD, Gidlow DA, Niewola Z. Influence of chronic low-level exposure to lead on plasma immunoglobulin concentration and cellular immune function in man // Int. Arch. Occup. Environ. Health. — 1986. — № 57. — P.117-125.
19. Basaran N., Undeger U. Effects of lead on immune parameters in occupationally exposed workers // Am. J. Med. — 2000. — V. 38. — P. 11-19.
20. Karakaya A., Yucesoy B., Sardas O.S. An immunological study on workers occupationally exposed to cadmium // Hum. Exp. Toxicol. — 1994. — № 3. — P. 73- 75.
21. Дмитруха Н.М. Стан імунної системи організму працівників типографії, експонованих важкими металами в умовах виробництва // Сб. "Гігієна труда". — 2004. — Вып. 35. — С.119- 129.
22. Стежка В.А., Дмитруха Н.Н., Покровская Т.Н. и др.. Влияние соединений тяжелых металлов из окружающей среды на состояние иммунной системы у механизаторов сельского хозяйства // Доклады та здоров'я. — 2002. — № 1(20). — С.6-12.

*И.М.Трахтенберг, Т.Ю. Громовой, В.А. Покровский,
Н.Н. Дмитруха, Г.В. Шевченко*

ИССЛЕДОВАНИЕ ВЛИЯНИЯ СВИНЦА И КАДМИЯ НА ИМУНОГЛОБУЛИН G ЧЕЛОВЕКА ПО ДАННЫМ MALDI-TOF МАСС-СПЕКТРОМЕТРИИ

Исследовано влияние свинца и кадмия на иммуноглобулин G человека с помощью MALDI-TOF спектрометрии. Инкубация иммуноглобулина с растворами солей металлов *in vitro* приводила к снижению интенсивности пиков в масс-спектрах данного белка. Полученные данные показали, что атомы металлов способны присоединяться к молекуле Ig G и его фрагментам (легким и тяжелым цепям). Кадмий проявлял большую активность к Ig G, чем свинец, что может указывать на более высокую реактивность относительно сульфгидрильных групп. Атомы кадмия оказывали также большее влияние на процесс стабилизации молекулы Ig G, следствием которого может быть изменение функциональной активности и способности Ig G к образованию иммунных комплексов.

*I.M.Trakhtenberg, T.Yu. Gromovoy, V.A. Pokrovskiy,
N.N. Dmytrukha, G.V. Shevchenko*

RESEARCH OF LEAD AND CADMIUM INFLUENCE ON HUMAN IMMUNOGLOBULIN G BY MALDI-TOF MASS-SPECTROMETRY

The influence of lead and cadmium on human immunoglobulin G by MALDI-TOF mass-spectrometry was investigated. Incubation of immunoglobulin with metals *in vitro* resulted in inhibition of intensity of mass-spectrum pikes. Findings showed that the metal atoms are able to join with Ig G molecule and its fragments (light and heavy chains). It was shown that cadmium had higher activity to bind to Ig G than lead. This fact reflected the cadmium high affinity for sulfhydryl groups. The cadmium had also greater influence on the stabilization of Ig G molecule, that can affect functional activity and ability of Ig G to form the immune complexes.