

Globulina Gc u świń

ANNA RZAŚA, WOJCIECH NOWACKI, TADEUSZ STEFANIAK, MARIA NIKOŁAJCZUK

Zakład Prewencji i Immunologii Weterynaryjnej Wydziału Medycyny Weterynaryjnej AR, ul. Norwida 31, 50-376 Wrocław

Rzaśa A., Nowacki W., Stefaniak T., Nikolajczuk M.

Gc-globulin in swine

Summary

Gc-globulin has been described as a vitamin D binding protein, a scavenger of non-saturated fatty acids, an endotoxin, and as the inhibitor of C5a proteoases. Desialisation of Gc-protein reveals its macrophage-activating ability. One of the most interesting properties of the Gc-globulin is its intracellular actin binding capability released after the disintegration of the cell and thus protecting against disseminated intravascular coagulation induced by polymerized forms of actin. The aim of the research was: to confirm the cross reactivity of rabbit's immune serum (IS) anti human Gc with the Gc of pigs, horses, cows and dogs; to use the obtained antibodies to quantity determine Gc in piglets; to determine the physiological level of this globulin and changes in its concentration in sick piglets. Polyclonal rabbit antibodies were raised against human Gc-globulin. Their cross reactivity with horse, cattle, dog and swine sera was confirmed. A radial immunodiffusion test was developed to determine the Gc-globulin concentration in piglets' sera. It was shown that Gc-globulin concentration changes with age, and its level is significantly higher in sick piglets than in healthy ones. The obtained results encourage further investigations in order to determine the value of Gc globulins in estimating the status of healthy and diseased animals.

Keywords: Gc-globulin, pigs, health monitoring

Białko Gc jest α globuliną o masie 58 kD, występuje w postaci pojedynczego łańcucha polipeptydowego, syntetyzowanego w wątrobie (5, 10). Znajduje się w osoczu i innych płynach tkankowych w koncentracji 6,25-9,80 $\mu\text{mol/L}$ (350-550 mg/L). Występuje także w formie związanej z błonami komórkowymi (4, 5).

Globulinę Gc opisał po raz pierwszy Jan Hirszfeld w 1959 r., jako białko transportowe, należące do białek polimorficznych, grupowo specyficznych (6, 11).

Pierwsze opisane jej właściwości to znaczny polimorfizm, który wzbudził zainteresowanie patologów sądowych i genetyków populacji (5, 14).

Białko Gc posiada trzy podstawowe fenotypy: Gc1S, Gc1F i Gc2. Poszczególne fenotypy są ważnymi wskaźnikami podatności na choroby i mogą być uważane za czynniki ryzyka (8), np. allel Gc2 występuje dwa razy częściej u pacjentów z chorobą reumatyczną (1). Poziom Gc wzrasta u kobiet ciężarnych, szczególnie z komplikacjami ciąży oraz biorących doustne środki antykoncepcyjne. Nie wzrasta w ostrej fazie zapalnej, maleje przy zaburzeniach pracy wątroby i chorobach nerek (4, 17, 18).

Pierwszą poznaną funkcją globuliny Gc był udział w transporcie witaminy D, stąd jej alternatywna nazwa – białko wiążące witaminę D (DBP – vitamin D binding protein) (4, 7). Jednak tylko mniej niż 5% znajdującego się w krążeniu Gc tworzy z witaminą D kompleks, a pozostała część pełni inne funkcje, jak np.: wychwytywanie nienasyconych kwasów tłuszczowych

i endotoksyny, aktywację makrofagów oraz ochronne działanie wobec niektórych składowych dopełniacza [C5a] (4, 5, 9, 13, 19).

Najważniejszą jednak funkcją globuliny Gc jest wiązanie (z podobnym powinowactwem przez wszystkie 3 fenotypy) uwolnionej z komórek aktywności (4, 5).

Aktywność jest białkiem odgrywającym istotną rolę w homeostazie. Stanowi ona 20-30% białka komórkowego, jej ilość zależy od typu komórki i stanu jej aktywności (4). Budowa komórki, jej wzrost, zmiany kształtu i ruchliwość zależą od zdolności monomerów aktywności do polimeryzacji w filamenty aktywności. Z chwilą opuszczenia komórki (uszkodzonej lub martwej) zdolność aktywności do polimeryzacji staje się groźna. Obecność w świetle naczyń krwionośnych form polimerycznych, które mogą osiągać nawet 10 μm długości, grozi indukcją śródnaczyniowego wykrzepiania i w dalszej konsekwencji nawet śmiercią zwierzęcia. Filamenty aktywności znaleziono w świetle naczyń i przyłączone do śródbłonna, białko to może współdziałać z włóknikiem w procesie krzepnięcia (4).

Aktywność może występować w dwóch formach: monomerycznej – G i polimerycznej – F (filamentarnej). Osocze ma zdolność rozbijania F-aktywności dzięki obecności dwóch białek: gelsoliny i globuliny Gc. Ten niedawno opisany pozakomórkowy system zmiatania aktywności (extracellular actin scavenger system – EASS) należy do mechanizmów homeostazy i polega na szybkiej depolimeryzacji filamentów aktywności do form mo-

nomerycznych, następnie wyłapaniu ich i usunięciu z krążenia (2-4, 10). System ten chroni organizm przed szkodliwym wpływem wewnątrzcząsteczkowej aktywności uwolnionej z komórek podczas normalnej przemiany komórkowej, jak i patologicznej śmierci komórek.

W odróżnieniu od gelsoliny, która wiąże zarówno filamenty, jak i monomery aktywności, Gc wyłapuje tylko monomeryczną formę aktywności i tworzy z nią trwałe kompleksy (4, 5). Globulina ta wyłapuje aktywność aktywniej niż profilina czy gelsolina.

Celem badań było:

- potwierdzenie występowania krzyżowych reakcji króliczej immunosurowicy (IS) anty Gc człowieka z Gc świni, konia, krowy i psa,
- zastosowanie tych przeciwciał do ilościowego oznaczania Gc u prosiąt,
- określenie fizjologicznego poziomu tego białka i ewentualnych zmian jego koncentracji u chorujących prosiąt.

Materiał i metody

Badania przeprowadzono w trzech etapach.

W pierwszym etapie uzyskano poliklonalne przeciwciała królicze anty Gc człowieka. W tym celu immunizowano domięśniowo królika białkiem Gc firmy Sigma, z pełnym adiuwantem Freund'a. Antygen podano 5-krotnie w odstępie 14 dni. Po dwóch tygodniach od ostatniej dawki pozyskano całość surowicy odpornościowej.

W drugim i trzecim etapie przeprowadzono oznaczenia białka Gc. Szczegóły tej części badań podano w tab. 1.

Tab. 1. Układ doświadczenia

Etap drugi – oznaczenia jakościowe	
I	Surowice prosiąt, konia, psa, bydła
Etap trzeci – oznaczenia ilościowe	
II	Prosiąta 21-dniowe 14 osesków zdrowych według oceny zewnętrznej 14 osesków z wyraźnymi objawami chorobowymi (biegunka, chartactwo)
III	Prosiąta 42-dniowe 14 sztuk (2 tygodnie po odsadzeniu)

Etap drugi obejmował wstępne (jakościowe) oznaczenia białka Gc metodą podwójnej immunodiffuzji wg Ouchterlony (16). Podwójną dyfuzję w żelu agarowym przeprowadzono w układzie heksagonalnym wokół centralnego dołka z przeciwciałami. Do dołków obwodowych naniesiono badane surowice 2 prosiąt (1, 2), cielęcą (3), konia (4), psa (5) i raz jeszcze IS (6). Płytkę inkubowano w komorze wilgotnej przez 24 h. Po upływie tego czasu odczytano wyniki (ryc. 1).

W trzecim etapie oznaczono ilościowo globulinę Gc – metodą immunodiffuzji radialnej wg Mancini (12). Immunodiffuzję radialną w przygotowanym żelu agarowym z dodatkiem surowicy anty Gc nanoszono w dwóch powtórzeniach do dołków wyciętych w żelu (w ilości 10 µl do dołka). Płytkę inkubowano w komorze wilgotnej w temperaturze pokojowej przez 48 godzin. Odczyt polegał na pomiarze średnicy precipitatu z dokładnością do 0,1 mm i na-

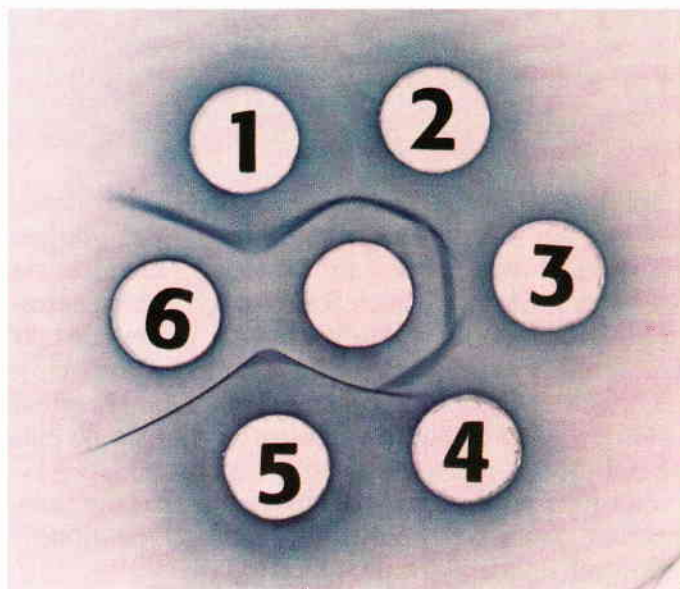
stępnie z krzywej standardowej odczytywano zawartość Gc w badanych surowicach. Dla wykreślenia krzywej standardowej do dołków nanoszono antygen homologiczny, czyli Gc człowieka w ilości: 500; 250; 125; 62,5; 31,25 µg/ml.

Uzyskane wyniki z oznaczeń ilościowych globuliny Gc podano jako wartości średnie i odchylenia standardowe. Istotność różnic w zawartości Gc u prosiąt zdrowych i chorych w 21. dniu życia określono przy pomocy testu t-Studenta.

Wyniki i omówienie

Podwójna immunodiffuzja

Wszystkie badane surowice reagowały krzyżowo z przeciwciałami królika anty-Gc człowieka, tworząc linię precipitacyjną, co przedstawiono na ryc. 1. Wyniki te potwierdzają doniesienia innych zespołów, które wykazały filogenetyczną konserwatywność globuliny Gc, co wyraża się w 48% homologii między Gc człowieka i świni, w 42% pomiędzy Gc człowieka i bydła, 93% pomiędzy Gc człowieka i psa i 82% pomiędzy Gc człowieka i kota (15). Cechę tę wykorzystano w niniejszej pracy do wykrycia globuliny Gc u prosiąt przeciwciałami anty Gc człowieka.



Ryc. 1. Immunoprecypitacja surowicy IS anty Gc człowieka z Gc surowic wybranych gatunków zwierząt

Immunodiffuzja radialna

W tab. 2 zestawiono wyniki zawartości globuliny Gc surowicy badanych prosiąt. Odczytu dokonano na podstawie krzywej standardowej uzyskanej z Gc ludzką. Średni poziom białka Gc zbadanej populacji wynosił 547,21 µg/ml. Najwyższe poziomy odnotowano u starszych osesków, co wskazuje na zmiany związane z wiekiem prosiąt. Pomiedzy prosiętami zdrowymi a chorymi wystąpiły w 21. dniu życia istotne różnice ($p \leq 0,01$). Stwierdzono większe zróżnicowanie w podgrupie chorych osesków (odchylenie standardowe) oraz większą rozpiętość uzyskiwanych wyników niż w analogicznej podgrupie osesków zdrowych.

Tab. 2. Poziom globuliny Gc w surowicy prosiąt (mg/L)

	21. dzień życia		42. dzień życia
	Prosięta chore	Prosięta zdrowe	Prosięta zdrowe
\bar{x}	517,55*	378,68*	746,40
\pm	82,69	60,68	173,65
min	366,66	210,00	325,00
max	608,33	450,00	958,00

Objaśnienie: * – różnice statystycznie istotne przy $p \leq 0,01$

Globulina Gc wydaje się kolejnym parametrem, oprócz białek ostrej fazy, wartym głębszej analizy w aspekcie monitorowania zdrowia. Jej poziomy odbiegające od średnich referencyjnych mogą być wczesną oznaką zaburzeń homeostazy organizmu, niekoniernie ujawniających się objawami choroby, ale np. spowolnieniem tempa wzrostu. Jej podwyższony poziom i następnie czas powrotu do normy też może być markerem określającym aktualną zdolność adaptacji zwierząt do niesprzyjających warunków. W różnych stanach chorobowych oznaczanie poziomów Gc całkowitej i w kompleksach z aktywną może okazać się miarodajnym źródłem informacji o efektywności leczenia i szansie powrotu do zdrowia (3). Trzeba jednak pamiętać, że uzyskane wyniki mogą być trudne do interpretacji w przypadku chorób przebiegających z uszkodzeniem wątroby. Poziomy niższe od referencyjnych poziomów minimalnych mogą w większości przypadków zwiastować niekorzystny rozwój choroby i zagrożenie śmiercią.

Uzyskane wyniki wydają się interesujące. Stwierdzono, że poziom globuliny Gc w surowicy prosiąt zmienia się z wiekiem i że ulega znacznym wahaniom w różnych stanach zdrowia zwierząt. Można oczekiwać, że poziom ten może być przydatnym markerem stanu zdrowia, zwłaszcza w różnych stanach podklinicznych. Jednak przed zaproponowaniem włączenia globuliny Gc do wachlarza rutynowych oznaczeń przy monitorowaniu zdrowia i przebiegu choroby w stadach zwierząt niezbędne są dalsze badania na większej populacji świń (jak i innych gatunków zwierząt), z podziałem na grupy wiekowe oraz w różnych, zdefiniowanych stanach chorobowych. Konieczne jest również wyizolowanie globuliny Gc specyficznej dla poszczególnych gatunków.

Piśmiennictwo

1. Bahr G. M., Eales L. J., Nye K. E., Majeed H. A., Yousof A. M., Behbehani K., Rook G. A.: An association between Gc (vitamin D-binding protein) alleles and susceptibility to rheumatic fever. *Immunology* 1989, 67, 126-128.
2. Dahl B., Schiødt F. V., Rudolph S., Ott P., Kiaer T., Heslet L.: Trauma stimulates the synthesis of Gc-globulin. *Intens. Care Med.* 2001, 27, 394-399.
3. Dahl B., Schiødt F. V., Gerchen P. M., Ramlau J., Kiaer T., Ott P.: Gc-globulin is an acute phase reactant and an indicator of muscle injury after spinal surgery. *Inflamm. Res.* 2001, 50, 39-43.
4. Franklin H., Epstein M. D.: Mechanisms of disease. *New Engl. J. Med.* 1992, 326, 1335-1341.
5. Haddad J. G.: Plasma Vitamin D-binding Protein (Gc-globulin): Multiple Tasks. *J. Steroid. Biochem. Molec. Biol.* 1995, 53, 579-582.

6. Hirschfeld J.: Immuno-electrophoretic differentiation of haptoglobins from another group-specific inheritable system in normal human sera. *Nature* 1960, 187, 126-128.
7. Hollis B. W., Draper H. H.: A comparative study of vitamin D binding globulins in milk. *Comp. Biochem. Physiol.* 1979, 64B, 41-46.
8. Ishii T., Keicho N., Teramoto S., Azuma A., Kudoh S., Fukuchi Y., Ouchi Y., Matsuse T.: Association of Gc-globulin variation with susceptibility to COPD and diffuse panbronchiolitis. *Eur. Respir. J.* 2001, 18, 753-757.
9. Kanda S., Mochizuki Y., Miyata Y., Kanetake H., Yamamoto N.: Effects of vitamin D₃-binding protein-derived macrophage activating factor (GcMAF) on angiogenesis. *J. Nat. Cancer Inst.* 2002, 94, 1311-1319.
10. Lee W. M., Reines D., Watt G. N.: Alterations in Gc protein levels and complexing in septic shock. *Circ. Shock* 1989, 28, 249-255.
11. Ljungqvist L., Hyldgaard-Jensen J.: Genetic polymorphism of the vitamin D binding protein (Gc protein) in pig plasma determined by agarose isoelectrofocusing. *Anim. Blood Groups Biochem. Gen.* 1983, 14, 293-297.
12. Mancini G., Vaerman J. P., Carbonara A. O., Heremans J. F.: A single radial diffusion method for the immunological quantitation of proteins, [w:] Peeters H. (Ed.), *Protides of the Biological Fluids*, Elsevier Publishing Comp., Amsterdam 1964, 370-373.
13. Mohamad B. S., Nagasawa H., Uto Y., Hori H.: Preparation of Gc protein-derived macrophage activating factor (GcMAF) and its structural characterization and biological activities. *Anticancer Res.* 2002, 22, 4297-4300.
14. Moiola F., Spycher M., Wyder-Walther M., Zwahlen R. D.: Comparative in vitro Phagocytosis and F-actin polymerization of bovine neonatal neutrophils. *J. Vet. Med. A* 1994, 41, 202-214.
15. Ogata M., Nakasono I., Iwasaki S., Kubo S., Suyama H.: Comparative immunological and electrophoretic analysis of Gc protein in sera from various animals. *Comp. Biochem. Physiol.* 1988, 90B, 193-199.
16. Ouchterlony O.: Antigen-antibody reactions in gels, *Acta Pathol. Microbiol. Scand.* 1949, 26, 507-515.
17. Schiødt F. V., Bondesen S., Petersen I., Dalhoff K., Ott P., Tygstrup N.: Admission levels of serum Gc-globulin: predictive value in fulminant hepatic failure. *Hepatology* 1996, 23, 713-718.
18. Schiødt F. V., Ott P., Bondesen S., Tygstrup N.: Reduced serum Gc-globulin concentrations in patients with fulminant hepatic failure: Association with multiple organ failure. *Crit. Care Med.* 1997, 25, 1366-1370.
19. Yamamoto N., Naraparaju V. R., Urade M.: Prognostic utility of serum α -N-Acetylgalactosaminidase and immunosuppression resulted from deglycosylation of serum Gc protein in oral cancer patients. *Cancer Res.* 1997, 57, 295-299.

Adres autora: dr Anna Rząsa, ul. Norwida 31, 50-375 Wrocław; e-mail: rzasa@ozi.ar.wroc.pl

GEURDEN T., VERELST A., SOMERS R., DIERICKX N., VERORUYSSSE J.: Skuteczność ivermektyny w stosunku do *Sarcoptes scabiei var. suis* u świń. (Efficacy of ivermectin against *Sarcoptes scabiei var. suis* in pigs). *Vet. Rec.* 153, 272-273, 2003 (9)

Badania przeprowadzono na 159 prosiątach w wieku od 12 tyg. zarażonych na drodze naturalnej *Sarcoptes scabiei var. suis* w 4 grupach doświadczalnych. W badaniu 1. i 2. w grupie I stosowano ivermektynę w dawce 300 μ g/kg domięśniowo, w grupie II lek podano podskórnym, w grupie III zastosowano iniekcje domięśniowe 0,9% chlorku sodowego. W badaniu 3. i 4. w grupie I stosowano ivermektynę w paszy w dawce 50 μ g/kg/dzień przez 14 dni, w grupie II w dawce 55 μ g/kg/dzień przez 14 dni, w grupie III w dawce 60 μ g/kg/dzień przez 14 dni i w grupie IV w dawce 65 μ g/kg/dzień przez 14 dni, w grupie V w dawce 70 μ g/kg/dzień przez 19 dni, w grupie VI w dawce 100 μ g/kg/dzień przez 7 dni, w grupie VII w dawce 140 μ g/kg/dzień przez 5 dni. Ivermektyna zastosowana w iniekcji podskórnej uwalniała świnie od pasożytów w ciągu 7 dni. W doświadczeniu 3. i 4. świnie leczone przez 5, 7 lub 10 dni były wolne od świerzbowca 7. dnia po rozpoczęciu leczenia, zaś świnie leczone przez 14 dni były wolne od zarażenia po 14 dniach po rozpoczęciu leczenia.