

Очищення препаратів фактора переносу імунної сенсibiliзації до антигенів стафілокока

Л. С. Холодна, Т. А. Любченко, О. Г. Голева, Л. О. Михальський

Київський національний університет імені Тараса Шевченка
Вул. Володимирська, 64, Київ, 01017, Україна

У роботі представлено дані щодо методики одержання, очищення та фракціонування препаратів фактора переносу імунної сенсibiliзації людського та тваринного походження. Виявлено подібність молекулярних мас та хроматографічних профілів елюції імуноактивних субстанцій всіх препаратів. За допомогою електрофорезу в поліакриламідному гелі показано, що ці субстанції містяться у фракціях з молекулярною масою до 14 кДа.

Вступ. Фактор переносу — це імуномодулятор природного походження, виділений з лейкоцитів тварин, які мають високий рівень імунної реактивності до певного антигена. Сьогодні в багатьох країнах (США, Мексика, Австралія, Франція, Італія, Японія, Китай та ін.) цей препарат успішно застосовується як антигенспецифічний імуностимулятор при лікуванні широкого спектра бактеріальних, вірусних, інвазивних та онкологічних захворювань. Сучасний стан вивчення цього питання, зокрема, гіпотези щодо механізму дії, хімічної будови та клінічного застосування описані авторами даної статті раніше [1]. Багато фундаментальних питань ще залишаються не до кінця вирішеними. Це може бути пов'язано з переважно комерційним клінічним застосуванням препаратів фактора переносу, що в багатьох випадках обмежується лише констатацією імуностимулюючого лікувального ефекту.

Метою даного дослідження було одержання препаратів фактора переносу з лейкоцитів сенсibiliзованих донорів, їхнє гель-хроматографічне очищення, виділення імуноактивної фракції.

Матеріали і методи. Для одержання препаратів фактора переносу використовували такі антигени: 1) корпускулярний антиген *Staphylococcus aureus* Cowan-1 (2352), *S. aureus* Wood-46 (2351), одержані з Чехословацької колекції мікроорганізмів. Культури стафілокока вирощували на МПА

при температурі 37 °С протягом 24 год. Клітини відмивали ізотонічним розчином, інактивували при 90 °С протягом 30 хв. Використано суспензії в концентрації $2 \cdot 10^8$ клітин/мл; 2) клітинозв'язаний білок А стафілокока одержано в лабораторії кафедри мікробіології та загальної імунології біологічного факультету Київського університету імені Тараса Шевченка; 3) стафілококовий анатоксин вироблено в НДІ епідеміології та мікробіології РАМН (Москва). Цими антигенами імунізували людей, морських свинок, велику рогату худобу, з лейкоцитів яких отримували препарати фактора переносу.

Людей-донорів (60 чоловік) імунізували тричі з проміжком часу в тиждень, підшкірно (під лопатку) в дозі 0,5 мл (5 одиниць сенсibiliзації) стафілококового анатоксину. Імунізацію проводили на базі Київського НДІ гематології та переливання крові МОЗ України. Також імунізували тварин: биків віком 0,5 року (12 тварин) з дослідного господарства Національного аграрного університету, безпорідних морських свинок (30 тварин) з віварію НДІ фізіології при Київському університеті імені Тараса Шевченка. Тварин імунізували шляхом підшкірного (1 мл, $2 \cdot 10^9$ клітин/мл для биків і $2 \cdot 10^8$ для морських свинок) введення антигена (корпускулярного антигена стафілокока, клітинозв'язаного білка А) — тричі, з інтервалом часу в 7—9 дб. Перший раз антиген вводили в суміші (1:1) з неповним ад'ювантом Фрейнда. У тварин стан гіперчутливості сповільненого типу визначали *in vivo* за допомогою шкірних проб на розрешуючу

дозу (1/100 дози імунізації) відповідного антигена; у людей — *in vitro*, по інтенсивності пригнічення міграції лейкоцитів/макрофагів.

Фактор переносу імуної сенсibiliзації одержували з діалізованого безклітинного екстракту лейкоцитів донорів, які знаходилися у стані гіперчутливості сповільненого типу. Для одержання препаратів користувалися методикою [2] з модифікаціями. Виділені за стандартною методикою лейкоцити периферійної крові та клітини селезінки, тимусу, лімфатичних вузлів руйнували шляхом 10-разового заморожування—розморожування, після чого осад набував желеподібної консистенції. До екстракту додавали ДНКазу і Mg_2SO_4 та проводили його гідроліз протягом 30 хв при температурі 37 °С. Одержані екстракти переносили в стерильні діалізні трубки. Діаліз здійснювали протягом доби у пробірках, які містили по 1 мл стерильної бідистильованої апірогенної води на кожні 0,1 мл лейкоцитарного екстракту. Діалізат концентрували. Всі маніпуляції проводили на холоді в стерильних умовах. Одержані діалізати пропускали через ніроцелюлозні фільтри (діаметром 0,22 мкм) для стерилізації. Препарати стандартизували за вмістом нуклеїнових кислот та білка, які визначали спектрофотометрично в УФ області ($\lambda = 260$ і 280 нм відповідно). Фактор переносу, виділений з $5 \cdot 10^8$ клітин, за активністю відповідав одній Міжнародній одиниці, що корелює з літературними даними [3]. Препарати зберігали при температурі -10 °С або ліофілізували.

Для очищення одержаних препаратів застосовували гель-фільтрацію на колонці розміром 100 × 1,5 см, заповненій Sephadex G-25 [4]. Для елюції використовували бідистильовану апірогенну воду, швидкість елюції складала 30 мл/год.

Гель-хроматографічно очищені на Sephadex G-25 фракції препаратів фактора переносу досліджували на здатність індукувати стан гіперчутливості сповільненого типу *in vitro* в тесті на пригнічення міграції лейкоцитів/макрофагів, як показано в роботі [5]. Електрофорез досліджуваних зразків проводили за [6]. У роботі використовували гелі поліакриламідну («Merck», Німеччина) 14 %-ї концентрації.

Електрофорез здійснювали в комерційному апараті для вертикального електрофорезу («Хийу Каллур», Латвія) при напрузі 90 В і силі струму 25 мА на гелевій пластині протягом 2,5 год на холоді. Для візуалізації електрофореграм гелі фарбували кумасі блакитним R-250 («Serva», Німеччина). Для визначення відносних молекулярних мас використовували комерційний набір маркерних білків LMW («Pharmacia», Швеція) такого складу:

фосфорилаза В (94,0 кДа), бичачий сироватковий альбумін (67,0 кДа), овальбумін (43,0 кДа), карбоангідраза (30,0 кДа), соевий інгібітор трипсину (20,1 кДа), α -лактальбумін (14,4 кДа).

Результати і обговорення. Препарати фактора переносу, отримані та очищені за допомогою вищепованих методик, розділяли гель-фільтрацією на фракції і вивчали імуностимулюючу активність окремих фракцій. Після виходу вільного об'єму колонки та високомолекулярних сполук виділено три фракції. Одержані результати спектрофотометричного аналізу фракцій на вміст білка та нуклеїнових кислот по поглинанню при $\lambda = 260$ і 280 нм представлені на рис. 1—5, де наведено профілі хроматографічної елюції препаратів діалізованих екстрактів лейкоцитів на Sephadex G-25.

Як видно з представлених рисунків, всі досліджувані препарати фактора переносу мали подібні профілі хроматографічної елюції. Вміст білка та нуклеїнових кислот був у 4—5 разів нижчим у препараті фактора переносу, одержаному від контрольної групи донорів порівняно з імунізованими донорами.

Активність одержаних гель-хроматографічних фракцій препаратів фактора переносу визначали за загально прийнятими критеріями [7, 8] по їхній здатності індукувати стан гіперчутливості сповільненого типу у інтактних реципієнтів у тесті на пригнічення міграції лейкоцитів/макрофагів *in vitro*.

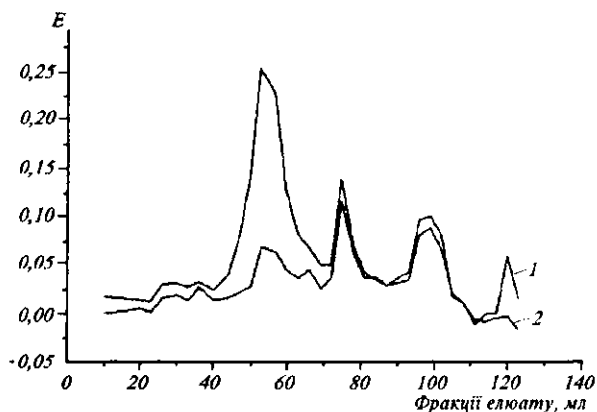


Рис. 1. Профіль елюції фактора переносу, виділеного з лейкоцитів інтактних людей-донорів. На цьому рисунку і на рис. 2—5 E — ступінь поглинання УФ-світла; 1, 2 — поглинання УФ-променів при $\lambda = 260$ і 280 нм відповідно

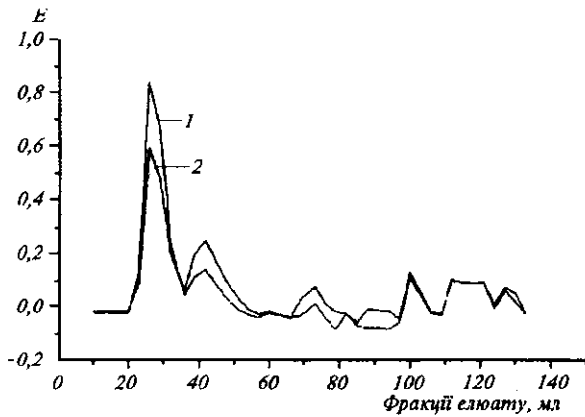


Рис. 2. Профіль елюції фактора переносу, отриманого з лейкоцитів биків, імунізованих корпускулярним антигеном стафілокока

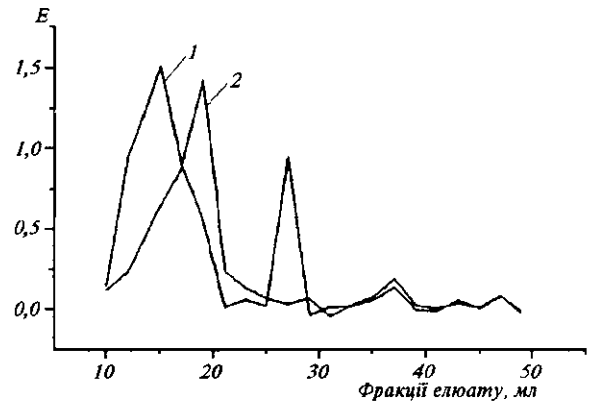


Рис. 4. Профіль елюції фактора переносу, виділеного з лейкоцитів крові морських свинок, імунізованих клітинозв'язаним білком А стафілокока

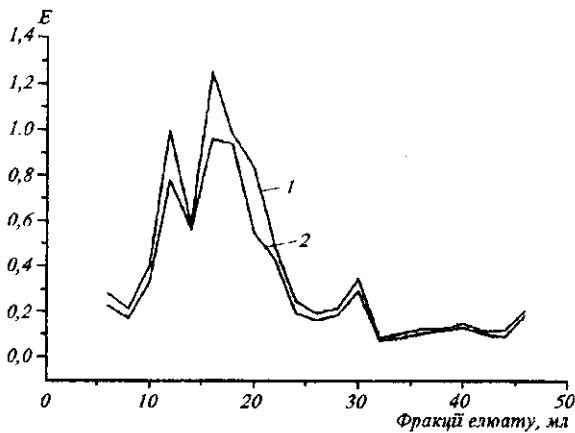


Рис. 3. Профіль елюції фактора переносу, виділеного з лейкоцитів селезінки морських свинок, імунізованих клітинозв'язаним білком А стафілокока

го. За результатами даного тесту можна стверджувати, що субстанція з властивостями фактора переносу міститься у першому хроматографічному піку, оскільки саме фракції цього піка пригнічували міграцію спленоцитів інтактних тварин (морських свинок) в достовірних межах. Матеріал даного піка мав найвищі показники поглинання в УФ світлі порівняно з наступними. Одержані дані проілю-

стровані на прикладі препарату фактора переносу до стафілококового анатоксину, виділеному з лейкоцитів людей-донорів (рис. 5). Подібні результати були одержані при дослідженні препаратів фактора переносу інших специфічностей.

Нами встановлено, що фракції з найвищим коефіцієнтом поглинання здатні переносити антигенспецифічну реактивність інтактним реципієнтам та володіють імуноактивуючими властивостями [8-10], що є важливим для характеристики досліджуваної субстанції.

У результаті електрофоретричного дослідження складу препаратів фактора переносу перед хроматографічним очищенням та після нього показано, що нативний препарат грубо очищеного лізату клітин містить велику кількість речовин білкової природи (не менше 11) з молекулярними масами від 20 до 120 кДа, а також фракції низькомолекулярних сполук (до 14,4 кДа). В результаті проведеного очищення в імуноактивних фракціях не виявлено білкових полімерів з молекулярною масою більше 14,4 кДа. Враховуючи здатність Sephadex G-25 фракціонувати низькомолекулярні сполуки можна припустити, що повнішу інформацію стосовно компонентного складу одержаних препаратів фактора переносу можливо буде одержати при дослідженні в градієнтних електрофоретичних системах.

Висновки. З лейкоцитів сенсibilізованих донорів та тварин отримано лізат та вивчено його деякі фізико-хімічні властивості.

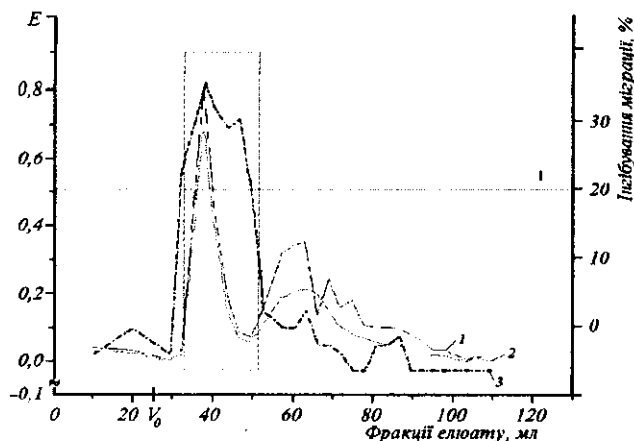


Рис. 5. Профіль елюції препарату фактора переносу, імунної реактивності до стафілококового анатоксину, виділеного з крові людей-донорів (1 — E₂₆₀; 2 — E₂₈₀) та активність фракцій в реакції пригнічення міграції лейкоцитів/макрофагів (3)

Досліджувані препарати, одержані від людини та тварин, мали подібний профіль елюції на Sephadex G-25. Кількість білків та нуклеїнових кислот вища в препаратах, отриманих від сенсibilізованих донорів; ці ж препарати є імуноактивнішими.

Хроматографічно очищені досліджувані імуноактивні фракції препаратів фактора переносу містять низькомолекулярні імуноактивні субстанції з молекулярною масою до 14 кДа.

Л. С. Холодная, Т. А. Любченко, Е. Г. Голева,
Л. О. Михальський

Очистка препаратов фактора переноса иммунной
сенсibilізации к антигенам стафилококка

Резюме

В работе представлены данные по методике получения, очистке и фракционированию препаратов фактора переноса иммунной сенсibilізации человеческого и животного происхождения. Выявлено подобие молекулярных масс иммуноактивных субстанций всех препаратов. С помощью электрофореза в полиакриламидном геле показано, что эти субстанции содержатся во фракциях с молекулярной массой до 14 кДа.

L. S. Kholodna, T. A. Lyubchenko, O. G. Goleva, L. O. Mikhalsky
Purification of transfer factor of immune sensitization to
staphylococcal antigen substances

Summary

The article presents the methods of obtaining, purification and fractionation of human and animal preparations of transfer factor immune sensitization. The similarity in molecular masses and gel-chromatography elution profiles has been shown. Using electrophoresis in polyacrilamide gel it has been demonstrated that such substances are contained in fractions with the molecular mass lower than 14.4 kDa.

ПЕРЕЛІК ЛІТЕРАТУРИ

1. Любченко Т. А., Голева О. Г., Холодна Л. С., Смірнов В. В., Вершигора А. Ю. Біологічна активність фактора переносу, індукованого бактеріальними антигенами // Мікробіол. журн.—1997.—59, № 5.—С. 83—100.
2. Lawrence H. S. The transfer of generalized cutaneous hypersensitivity of the delayed tuberculin type in man by means of the constituents of disrupted leukocytes // J. Clin. Invest.—1954.—33.—P. 951.
3. Fudenberg H. H., Pizza G. Transfer factor 1993: New frontiers // Progr. Drug Res.—1994.—42.—P. 309—400.
4. Rozzo J. S., Kirkpatrick C. H. Purification of transfer factors // Mol. Immunol.—1992.—29, N 2.—P. 167—182.
5. Голева О. Г., Любченко Т. А., Холодна Л. С., Вершигора А. Ю. Фактор переносу морських свинок до антигенних субстанцій стафілокока // Фізіол. журн.—1996.—42, № 5—6.—С. 58—65.
6. Laemmli U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 // Nature.—1970.—227, N 15.—P. 680—685.
7. Иммунологическая инженерия / Под ред. Д. Джирша.—М.: Медицина, 1982.—298 с.
8. Любченко Т. А., Голева О. Г., Холодна Л. С., Степанчук В. А., Вершигора А. Ю. Людський специфічний Фактор переносу до антигенів *Staphylococcus aureus* // Фізіол. журн.—1997.—43, № 3—4.—С. 25—32.
9. Lyubchenko T. A., Goleva E. G., Kholodna L. S., Pozur V. K. Studies of mechanism of action of leukocyte dialysates on functional activity of T- and B-lymphocytes: Congr. of Mol. Medicine (Berlin, Germany, 1997) // J. Mol. Med.—1997.—75, N 5.—P. B59.
10. Любченко Т. А., Голева О. Г., Холодна Л. С., Позур В. К. Очистка, тестування та вивчення механізму дії люського та тваринного Фактора переносу до бактеріальних антигенних субстанцій // 7-й Укр. Біохім. з'зд.—Київ, 1997.—Т. 1.—С. 90—91.

УДК 612.017.1:57.041
Надійшла до редакції 17.11.98