

О.В. БЕЛОВА, В.Я. АРИОН,
И.В. ЗИМИНА, Ю.М. ЛОПУХИН,
О.Б. СЫСОЕВА,
Т.А. ЛУКАНИДИНА,
М.Н. НЕКРАСОВА
Научно-исследовательский
институт
физико-химической медицины
МЗ РФ, Москва

УДК 612.017.1:57.041

СРАВНИТЕЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ИММУНОТРОПНЫХ ПРЕПАРАТОВ ИЗ КОЖИ

В разработанный ранее метод получения иммуотропных препаратов из кожи свиньи были введены этапы высаливания сульфатом аммония. На основе нового метода были выделены три препарата с теми же молекулярными массами, что и препараты, полученные методом, разработанным ранее. Определено содержание белка, РНК, углеводов и общих липидов. Изучены некоторые иммунологические свойства препаратов: все три препарата увеличивали количество антителообразующих клеток селезенки мышей на пике первичного иммунного ответа и восстанавливали чувствительность фоновых розеткообразующих клеток (РОК) селезенки тимэктомированных мышей к ингибирующему действию азатиоприна.

Проведен сравнительный анализ физико-химических и иммунологических свойств препаратов, полученных двумя методами: без высаливания и с высаливанием. Показано, что введение процедуры высаливания сульфатом аммония привело к изменению физико-химических свойств препаратов с аналогичными молекулярными массами: увеличению содержания белка в препаратах и уменьшению содержания РНК, углеводов и общих липидов.

Введение этапов высаливания способствовало получению новых иммунологических свойств. Так, препарат №1 (молекулярная масса более 15 кДа) и препарат №2 (молекулярная масса от 1,4 до 15 кДа) стали проявлять активность в тесте восстановления чувствительности фоновых РОК селезенки тимэктомированных мышей к ингибирующему действию азатиоприна, в то время как препараты с аналогичными молекулярными массами, выделенные методом без высаливания, такой активности не проявляли. Изменился характер зависимости активности всех трех препаратов от дозы в методе Эрне.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: иммуотропные препараты, цитокины, В-иммунитет, Т-иммунитет, кожа.

Иммунопатология, аллергология, инфектология 2001, 2: 15-21.

COMPARATIVE CHARACTERISTICS OF IMMUNOTROPIC PREPARATIONS FROM SKIN

*O.V.BELOVA, V.IA.ARION, I.V.ZIMINA, I.M.LOPUKHIN, O.B.SYSOIEVA,
T.A.LUKANIDINA, M.N.NEKRASOVA*

Research Institute for Physico-Chemical Medicine, Russian Ministry of Health, Moscow, Russia

New stages of protein precipitation with ammonium sulfate were added to the previously elaborated method of isolation of immunotropic preparations from pig's skin. On the base of new modified method three preparations were obtained with the

same molecular masses as those, prepared by the previous method. Quantity of proteins, RNA, carbohydrates and total lipids was determined. Some immunological properties of new preparations were studied. It was found out that all three preparations increased the number of antibody-producing cells in mouse spleen on the peak of the primary immune response (Jerne method) and restored sensitivity of spontaneous spleen E-rosette forming cells (E-RFC) of thymectomized mice to inhibitory action of azathioprin.

Comparative analysis of physico-chemical and immunological properties of preparations, obtained by both methods – without protein precipitation stage and with it, showed that introduction of protein precipitation stage with ammonium sulfate led to the change of physico-chemical properties of preparations with analogous molecular masses, that is to increase of proteins content and decrease of RNA, carbohydrates and total lipids content.

Introduction of the new stage of protein precipitation with ammonium sulfate promoted the augmentation of immunological activity: preparations N 1 and N 2 began to manifest activity in the test of restoration of sensitivity of E-RFC of thymectomized mice to inhibitory action of azathioprin. It is necessary to note that these fractions, isolated by previous method without protein precipitation stage, were not active in this test. The character of dose dependence of activity of all three preparations in Jerne method changed.

KEY WORDS: *immunotropic preparations, cytokines, B-immunity, T-immunity, skin. Immunopathol., allergol., infectol. 2001, 2: 15-21.*

Одной из перспективных проблем прикладной иммунологии является разработка и создание новых иммунотропных препаратов. Ранее авторами данной статьи был разработан метод выделения иммуноактивных препаратов из кожи свиньи [1]. Используя этот метод, были выделены три препарата, изучены их физико-химические свойства, показано их влияние на некоторые иммунологические параметры, а также на пролиферацию и дифференцировку кератиноцитов человека в первичной культуре. [2, 3, 4, 5]. Было показано, что препарат с молекулярной массой от 1,4 до 15 кДа может быть с успехом использован для лечения псориаза [6]. Изучение физико-химических свойств препаратов показало, что все они, помимо белков и углеводов, содержат РНК. Для получения более чистых белковых препаратов мы ввели этапы высаливания сульфатом аммония в разработанный ранее метод.

Целью данной работы было: выделить препараты из кожи свиньи новым методом, включающим этапы высаливания сульфатом аммония; изучить их физико-химические и некоторые иммунологические свойства; провести сравнительный анализ физико-химических и иммунологических свойств препаратов, полученных двумя методами: без высаливания и с высаливанием.

Материалы и методы. В метод получения препаратов из кожи свиньи, разработанный ранее [1, 2, 4], мы ввели этапы высаливания сульфатом аммония – один из широко применяемых способов очистки белков. “Ацетоновый порошок” получали по методу, разработанному ранее [1, 4]. Затем его растворяли в 0,01М трис-НСl буфере рН 8,0 при комнатной температуре и центрифугировали при 10000g в течение 20 мин. при 4°C. Осадок отбрасывали, а к супернатанту добавляли насыщенный раствор сульфата аммония в соотношении 3:1 при 4°C. Нерастворимую часть удаляли центрифугированием при 10000g в течение 50 мин. при 4°C. Доводили рН супернатанта до 4,0 с помощью 10% раствора уксусной кислоты. Затем добавляли сухой сульфат аммония при постоянном помешивании из расчета: 14,6 г - на 100 мл супернатанта и 30 г - на 100 мл уксусной кислоты, перемешивали при комнатной температуре и центрифугировали при 12000g в течение 30 мин. при 4°C. Супернатант сливали, осадок гомогенизировали в 0,01М трис НСl рН 8,0. Затем насыщенный раствор сульфата аммония прикапывали к гомогенату в ледяной бане в соотношении 1,5:1 и центрифугировали при 18000g в течение 30 мин. при 4°C. Супернатант сливали, осадок гомогенизировали в минималь-

ном объеме 0,01M трис-HCl + 0,15M NaCl pH 8,0 и центрифугировали при 18000g в течение 30 мин. при 4°C. Осадок отбрасывали, а супернатант наносили на колонку 2,5x100 см с сефадексом G-50 с маркерами: голубым декстраном и DNP-L-аланином. Собирали три фракции с теми же молекулярными массами, что и разработанным ранее методом без высаливания [1], обезсоливали и лиофилизировали.

В препаратах определяли содержание белка по методу Лоури [7] и биуретовым методом [8], содержание углеводов - антроновым методом [9], РНК - по Шмидту и Таннгаузеру [10] и общих липидов - сульфопосфованилиновым методом [11].

Количество антителообразующих клеток (АОК) селезенки мышей СВА на пике первичного иммунного ответа определяли по методу Эрне [2,12]. Эритроциты барана вводили внутривенно в 0,5 мл физиологического раствора в концентрации 400 млн/мл. Одновременно подкожно вводили испытуемые препараты в дозе 1, 10 и 100 мкг на мыш. На пятые сутки животных забивали, выделяли селезенку и подсчитывали число зон гемолиза в чашках Петри. Определяли процент АОК по отношению к контролю, принимая среднюю арифметическую в контрольной группе за 100%. Все результаты соотносили со средней арифметической в контрольной группе.

Восстановление чувствительности фоновых розеткообразующих клеток (фРОК) селезенки тимэктомированных мышей к ингибирующему действию азатиоприна определяли по методу Баха [13]. Мышей-самцов С57В1/6 тимэктомиро-

вали в возрасте 6-7 недель для создания модели частичного иммунодефицита по Т-системе иммунитета и брали в опыт через 2-8 недель после операции. Получали суспензию клеток селезенки. В опытные пробы помимо азатиоприна добавляли испытуемые препараты до конечной концентрации 1, 5, 10, 20, 50 и 100 мкг/мл. Подсчитывали количество фРОК селезенки тимэктомированных мышей на 10⁴ ядросодержащих клеток. Результаты выражали в процентах фРОК по формуле:

$$A = \frac{M_o}{M_k} \times 100\% ,$$

где A - процент фРОК;

M_к - средняя арифметическая фРОК в контроле;

M_о - то же самое в опыте.

Активными считали фракции, для которых процент фРОК (A) был менее 50%. Для сравнения активности препаратов определяли минимальную концентрацию, при которой препарат проявлял активность.

Достоверность различий между выборками оценивали с использованием непарного параметрического t критерия Стьюдента или непарметрического критерия Вилкинсона-Манна-Уитни.

Результаты исследования

Профиль элюции супернатанта, полученного новым методом, включающим этапы высаливания, на колонке с сефадексом G-50 представ-

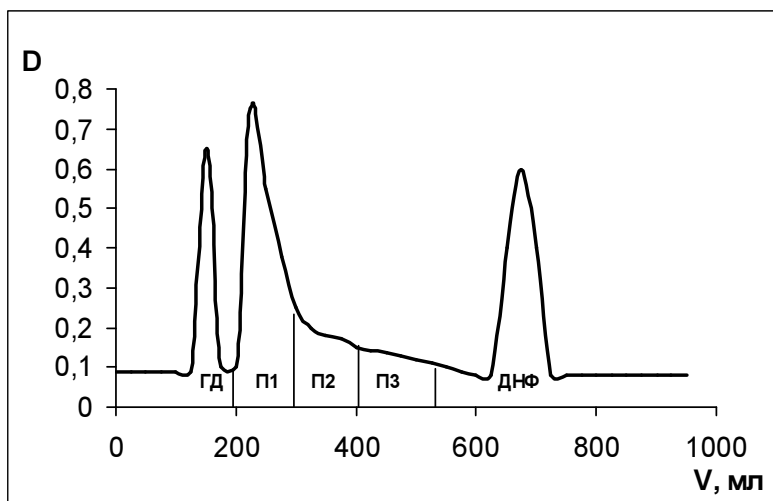


РИС. 1.

Профиль элюции супернатанта на колонке с Сефадексом G-50.

ГД – голубой декстран (2000 кДа), ДНФ – ДНФ-аланин (255 Да).

Здесь и на рис. 2, 3: П1, П2, П3 – препараты №1, №2 и №3.

лен на рис.1. Собирали фракции с теми же молекулярными массами, что и фракции, полученные методом без высаливания: фракция №1 - молекулярная масса более 15 кДа (препарат №1, П1), фракция №2 - от 1,4 до 15 кДа (препарат №2, П2) и фракция №3 - менее 1,4 кДа (препарат №3, П3).

Определяли содержание белка, углеводов, РНК и общих липидов. Данные представлены в таблице 1. Как видно из представленных данных, содержание белка падает от П1 к П3, в то время как содержание углеводов нарастает. Содержание РНК колеблется в пределах от 1,2 до 3,2%, а содержание общих липидов от 0,5 до 1,9%. Надо отметить, что содержание белка в препаратах №1 и №2, определяемое методом Лоури и биуретовым методом, практически не отличается между собой. В то же время его содержание в П3, определяемое биуретовым методом, в 8,6 раз больше, чем по методу Лоури (различия достоверны, $p > 0,95$).

Биуретовый метод отличается точностью, выход по окраске мало меняется от белка к белку, т.к. реактив взаимодействует с пептидной цепью [14]. При изучении метода Лоури было установлено, что любая пептидная связь дает некоторую окраску, но определенные последовательности аминокислот, и притом не обязательно содержащие ароматические остатки, дают более интенсивную окраску, чем другие; они и обуславливают главным образом окраску, развиваемую белком [14]. Поскольку методом Лоури мы выявляем гораздо меньше белка, чем биуретовым методом, можно предположить, что П3 не содержит эти определенные последовательности аминокислот. Можно также заключить, что биуретовый метод более полно выявляет белки, содержащиеся в П3.

Было изучено влияние препаратов на количество АОК селезенки мышей на пике первичного иммунного ответа. Данные представлены на рисунке 2 А.

Таблица 1

Процентное содержание белка, углеводов, РНК и общих липидов ($M \pm m$) в препаратах из кожи, полученных двумя методами: с высаливанием и без высаливания

Номера препаратов	Методы	П1	П2	П3
Белок (биуретовый метод)	Высаливание	97 ± 2,9	83 ± 11	25 ± 7,4
	без высаливания	87 ± 7,3	56 ± 6,0	15 ± 2,0
Белок (метод Лоури)	Высаливание	98 ± 3,3	76 ± 15	2,9 ± 0,3
	без высаливания	91 ± 2,9	51 ± 3,2	8,2 ± 1,1
Углеводы	Высаливание	0,51 ± 0,06	3,9 ± 0,2	5,9 ± 1,8
	без высаливания	0,74 ± 0,30	8,0 ± 1,4	9,0 ± 2,7
РНК	Высаливание	3,2 ± 0,6	1,2 ± 0,4	2,0 ± 1,1
	без высаливания	2,0 ± 0,4	5,4 ± 1,0	14 ± 2,4
Общие липиды	высаливание	1,9 ± 0,5	0,5 ± 0,2	1,0 ± 0,7
	без высаливания	2,2 ± 0,1	1,4 ± 0,3	1,4 ± 0,2

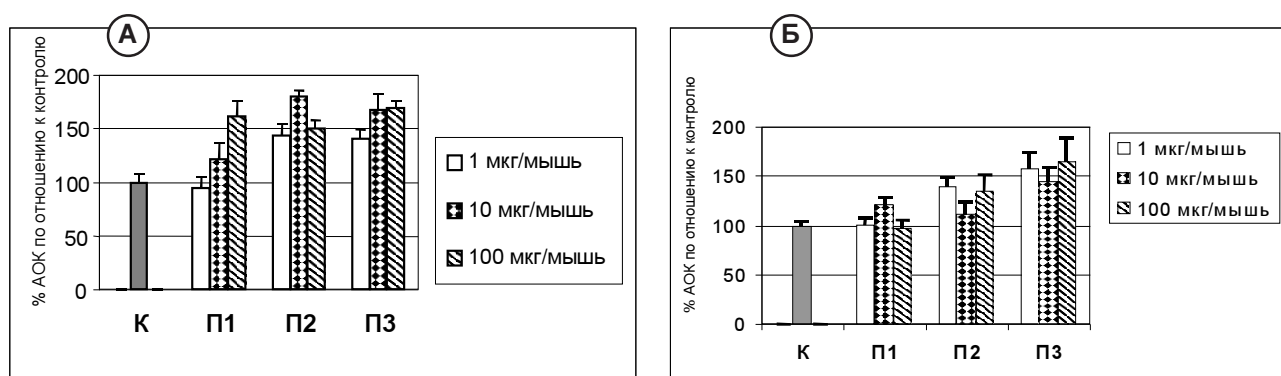


РИС. 2.

Влияние препаратов из кожи свиньи на количество антителообразующих клеток (АОК) селезенки мышей линии СВА на пике первичного иммунного ответа.

А - метод с высаливанием; Б - метод без высаливания.

Как видно из представленных данных, препараты П2 и П3 увеличивали количество АОК во всех исследованных дозах (1, 10 и 100 мкг/мышь). Различия с контролем достоверны по критерию Стьюдента. Препарат П1 достоверно увеличивал количество АОК лишь в дозе 100 мкг/мышь. Максимальный эффект оказывал препарат П2 в дозе 10 мкг/мышь (процент АОК составлял 180%). Поскольку АОК являются потомками В-лимфоцитов, можно говорить о стимулирующем влиянии препаратов на В-систему иммунитета.

Мы изучили влияние препаратов на восстановление чувствительности фРОК селезенки тимэктомированных мышей к ингибирующему действию азатиоприна. Данные представлены на рисунке 3 А.

Как видно из представленных данных, активными в данном тесте оказались все три препарата. Препараты №1 и №3 были активными в концентрации 20 мкг/мл, а препарат №2 - в концентрации 10 мкг/мл: процент фРОК для них был ниже 50%.

Тест восстановления чувствительности к азатиоприну применяется рядом исследователей для оценки активности тимических факторов [13]. Тимэктомия приводит к резкому снижению чувствительности фРОК селезенки, образующих розетки с эритроцитами барана, к азатиоприну, что связано с уменьшением количества зрелых Т-лимфоцитов. Тимические факторы восстанавливают это свойство, способствуя созреванию Т-клеток. В настоящем исследовании препараты из кожи восстанавливали чувствительность к азатиоприну, что говорит об их возможном влиянии на дифференцировку Т-клеток.

Затем мы сравнили физико-химические свойства препаратов, полученных двумя различными метода-

ми. В таблице 1 приведено сравнительное содержание белка, углеводов, РНК и общих липидов в препаратах, полученных разработанным ранее методом без высаливания и новым методом. Содержание белка, определяемое биуретовым методом, во всех трех препаратах, полученных методом с высаливания, выше по сравнению с препаратами, имеющими ту же молекулярную массу, а содержание углеводов и общих липидов ниже. Содержание белка по Лоури в П1 и П2, полученных методом с высаливанием, также выше, тогда как его содержание по Лоури в П3, полученном методом с высаливанием ниже, чем без высаливания. Разница в содержании белка в П3, определяемого по биурету и по Лоури составляет 1,6 раза для метода без высаливания и 8,6 раза для метода с высаливанием. Вероятно, П3, получаемый методом с высаливанием, еще более обеднен пептидами, содержащими определенную аминокислотную последовательность, которая дает максимальное окрашивание по методу Лоури [14].

Проведено сравнение содержания РНК в препаратах, полученных двумя методами. Как видно из представленных данных, содержание РНК в препаратах №2 и №3, полученных путем высаливания, гораздо меньше, чем в препаратах с аналогичными молекулярными массами, полученных без высаливания. Содержание РНК в П2 уменьшилось в 4,5 раза, а в П3 - в 7 раз, в то время как его содержание в П1 имеет тенденцию к увеличению, хотя различия недостоверны ($p > 0,05$).

Таким образом, введение этапов высаливания в метод получения привело к изменению физико-химических свойств препаратов: увеличилось содержание белка в препаратах с аналогичной молекуляр-

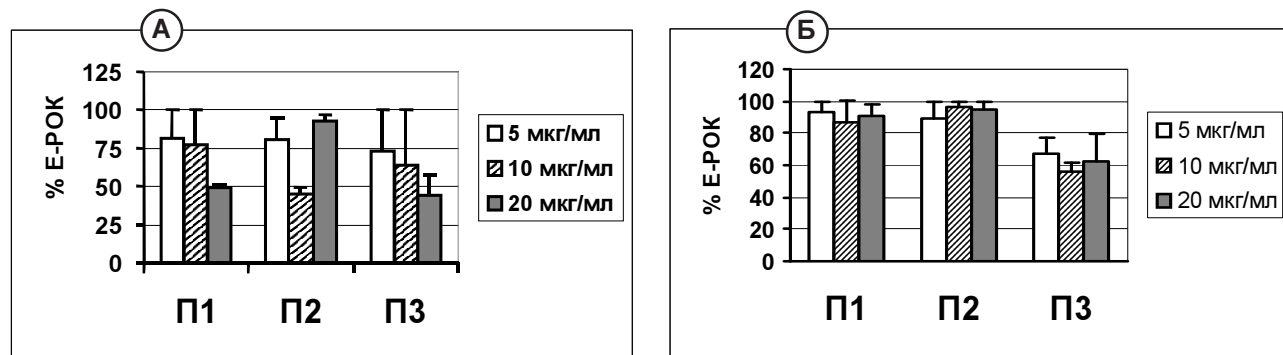


РИС. 3.

Влияние препаратов из кожи свиньи на восстановление чувствительности фоновых розеткообразующих клеток (фРОК) селезенки тимэктомированных мышей к ингибирующему действию азатиоприна. А) - метод с высаливанием; Б) - метод без высаливания.

ной массой, уменьшилось содержания углеводов и общих липидов; значительно сократилось содержание РНК в препаратах №2 и №3 и достоверно не изменилось их содержание в препарате №1.

Мы сравнили иммунологические свойства препаратов, полученных двумя различными методами. На рис. 2 (А, Б) приведен сравнительный анализ влияния препаратов, полученных обоими методами, на количество АОК селезенки мышей на пике первичного иммунного ответа. Активность препаратов, имеющих одинаковую молекулярную массу, но полученных различными методами, отличается. Максимальной активностью в данном тесте обладает препарат №3, полученный без высаливания и препарат №2, полученный с высаливанием. Кроме того, изменяется характер зависимости активности от дозы. Если П2, полученные методом без высаливания при дозе 10 мкг/мл имеют минимальную активность, то П2 с высаливанием - максимальную. П1 без высаливания имеет максимальную активность при дозе 10 мкг/мл, в то время как П1 с высаливанием - при дозе 100 мкг/мл.

Активность препаратов, полученных различными методами, также отличается в тесте восстановления чувствительности фоновых РОК тимэктомированных мышей к ингибирующему действию азатиоприна (рис. 3 А, Б). Из препаратов, полученных методом без высаливания, активностью в данном тесте обладал лишь П3, в то время как среди препаратов, полученных методом с высаливанием, активны все три. Препарат №3, полученный методом без высаливания, активен в концентрации 10 мкг/мл. Препарат №3, полученный методом с высаливанием, активен в концентрации 20 мкг/мл.

Выводы:

1. Разработан новый метод получения иммунотропных препаратов из кожи свиньи, включающий этапы высаливания. Этим методом были выделены три препарата с теми же молекулярными массами, что и ранее выделенные препараты.

2. Изучены физико-химические свойства препаратов: определено содержание белка, РНК, углеводов и общих липидов.

3. Изучены некоторые иммунологические свойства: показано, что все три препарата увеличивают количество антителообразующих клеток селезенки мышей на пике первичного иммунного ответа и восстанавливают чувствительность фоновых розеткообразующих клеток селезенки тимэктомированных мышей к ингибирующему действию азатиоприна.

4. Проведен сравнительный анализ физико-химических и иммунологических свойств препаратов, полученных двумя методами: без высаливания и с высаливанием. Он показал, что введение высаливания сульфатом аммония привело к изменению физико-химических свойств препаратов, имеющих одинаковую молекулярную массу: увеличилось содержание белка в препаратах и уменьшилось содержание РНК, углеводов и общих липидов.

5. Введение этапов высаливания привело к увеличению иммунологической активности: препараты №1 и №2 стали проявлять активность в тесте восстановления чувствительности фоновых РОК селезенки тимэктомированных мышей к ингибирующему действию азатиоприна. Изменился характер зависимости активности всех трех препаратов от дозы в методе Эрне.

ЛИТЕРАТУРА

1. Арион В.Я., Белова О.В., Орлова В.Ф., Капитанов А.Б., Лопухин Ю.М. Способ получения вещества из кожи свиньи, влияющего на пролиферацию и дифференцировку кератиноцитов человека. Бюл. изобрет. 1995; № 18: 24.
2. Арион В.Я., Белова О.В., Луканидина Т.А., Сысоева О.Б., Дворцова В.В., Бреусов Ю.Н. Иммунологические свойства препаратов из кожи. Бюлл. экспер. биол. мед. 2000; Т.129; № 2: 194-7.
3. Арион В.Я., Белова О.В.. Иммунологически активные препараты из кожи (обзор собственных данных). Inter. Jor. Immunorehab. 2000; Vol. 2; N 1: 33-6.
4. Белова О.В., Арион В.Я., Лопухин Ю.М. и др. Получение и свойства фракций из кожи, влияющих на пролиферацию и дифференцировку кератиноцитов человека. Rus. J. Immun. 1999; Vol. 4; N 2: 151-7.
5. Лопухин Ю.М., Арион В.Я., Иванова В.Ф., Белова О.В., Капитанов А.Б. Биологически активные вещества кожи, влияющие на пролиферацию и дифференцировку кератиноцитов человека. Бюл. экспер. биол. 1992; Т. 114; №. 11: 473-5.
6. Лопухин Ю.М., Воронцова Е.М., Белова О.В. и др. Способ лечения псориаза. Бюл. изобрет. открыт. 1997; № 20: 25.

7. Lowry O.H., Rosenbrough N.J., Farr A.L., Randall J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 1951; Vol. 193: 265-75.
8. Gornall A.C., Bardawill C.J., David M.M. Determination of serum proteins by means of the biuret reaction. *J. Biol. Chem.* 1949; Vol. 177: 751-66.
9. Seifter S. A method for the detection of carbo-hydrates by the anthrone reagent. *Arch. Biochem.* 1950; Vol. 25: 191-3.
10. Schmidt G., Tannhauser S.J. A method for the detection of desoxyribonucleic acid, ribonucleic acid and phosphoproteins in animal tissues. *J. Biol. Chem.* 1945; Vol. 161: 83-9.
11. Zollner N., Kirsch K. On the quantitative determination of lipids (micromethod) by means of the general sulfophosphanillin reaction of the many natural lipids (all known plasmalipids). *Zeitschrift fur gesamte experimentell Medizin.* 1962; Vol. 135: 545-61.
12. Зигль Э., Бем Э. Метод локального гемолиза в геле. В кн.: Иммунологические методы. - М.; 1979: 96-107.
13. Dardenne M., Bach J.-F. The sheep cell rosette assay for the evaluation of thymic hormones. In: *Biological activity of thymic hormones.* Eds. V. Bekkum, D.W. Rotterdam. N.Y.; 1975: 235-43.
14. Бейли Д. Определение белка. Методы химии белков. М.; 1965: 266