

УДК 615.365.12:612—017.1

В. Т. Антоненко, С. Ф. Городецкая, Н. П. Пеньковская,
Г. И. Корниенко

ПОЛУЧЕНИЕ И ИММУНОЛОГИЧЕСКОЕ ИЗУЧЕНИЕ АНТИЦИТОХРОМОКСИДАЗНЫХ СЫВОРОТОК К СЕРДЕЧНОЙ И СКЕЛЕТНОЙ МЫШЦАМ СОБАК

Изучению роли кардиотоксических сывороток в моделировании дистрофических поражений миокарда посвящены исследования ряда авторов [1, 3, 6, 10]. Существенный вклад в получение специфических кардиоцитотоксических сывороток был внесен группой исследователей [1—3, 8], которые в качестве антигена использовали различные цитоплазматические фракции, в частности митохондрии. Для повышения органной специфичности цитотоксических сывороток многие экспериментаторы используют в качестве антигенов различные ферменты, такие как нативная и модифицированная фосфорилаза [4], β -галактозидаза [15], ряд протеолитических ферментов [7], Na—K активизированная АТФаза [13], α -аспарагиназа [17]. Группе авторов удалось получить антитела к цитохрому С [18]. Цитохром С получили из лошадиного сердца, посадили на ацелированный γ -глобулин и со стимулятором Фрейнда еженедельно в течение двух месяцев вводили кроликам. Экспериментаторы наблюдали преимущественную выработку преципитирующих антител к цитохрому С. Другим авторам [16] удалось получить антитела к цитохромоксидазе, выделенной из сердечной мышцы быка и свиньи методом [19].

В наших опытах в качестве антигена была использована цитохромоксидаза, выделенная из сердца собак, относящаяся к ферментам, катализирующим окислительно-восстановительные реакции, лежащие в основе процессов биологического окисления, локализованная в митохондриях и непосредственно осуществляющая перенос электронов на кислород. Целью данного исследования было получение антицитохромоксидазной сыворотки, изучение ее иммунологической активности в опытах *in vitro*, а также проведение сравнительной оценки специфичности антицитохромоксидазных сывороток к цитохромоксидазе сердечной и скелетной мышц собак.

Методика исследований

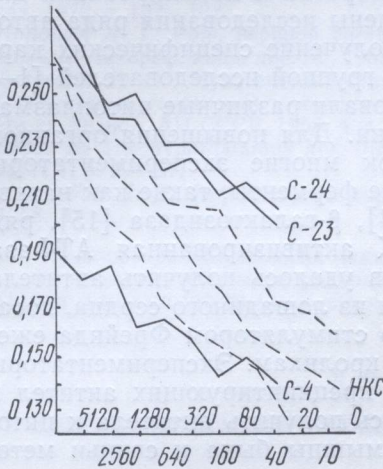
Цитохромоксидаза была получена из сердечной мышцы, а также из скелетных мышц собак по методу Окунуки [11]. Суть метода состоит в получении суспензии частиц из мышц (кашица по Грину). В качестве детергента, способствующего экстракции цитохромоксидазы из мембран митохондрий, использовали 10% раствор холата натрия (рН — 7,5). Кроме того, холат натрия приводит к почти полной диссоциации цитохрома С из нерастворимых частиц и очищает цитохромоксидазу от цитохрома С. В дальнейшем фермент очищался методом высаливания сульфатом аммония. Активность полученного фермента определяли по методу Штрауса [20]. Активность фермента выражали в индофенольных единицах на 1 мг белка за 5 мин инкубации при 37° С. Белок определяли по методу Лоури [14]. Выделенный фермент использовался в качестве антигена.

Для получения антицитохромоксидазной сыворотки кроликов иммунизировали по 1,5 мг/кг цитохромоксидазы подкожно с 0,5 мл полного адьюванта Фрейнда. Повторные

инъекции фермента в тех же количествах делали через 28—30 дней. Затем кроликов иммунизировали 2 дня по 1 и 1,5 мг цитохромоксидазы внутривенно. На 7—9 день после последней иммунизации брали кровь и определяли наличие преципитирующих антицитохромоксидазных антител по методу Уанье [5] и Оухтерлони [12]. Для иммунизации в опыт были взяты 40 кроликов, весом 2—2,5 кг породы шиншилла. При получении высоких титров цитохромоксидазных антител кроликов обескровливали, сыворотку в стерильных условиях ампулировали и хранили при +4° С.

Результаты исследований и их обсуждение

Из 90 собачьих сердец было выделено до 400 мг фермента, из скелетных мышц — до 100 мг фермента. Несмотря на снижение молекулярной активности цитохромоксидазы в ходе очистки, как отмечают некоторые авторы [21], активность выделенного нами фермента составляла 6—8 индофенольных единиц на 1 мг белка. Полученный фермент обладает высокой антигенной активностью, не оказывая при внутривенном введении в вышеуказанных количествах токсического действия. Получено 27 серий антицитохромоксидазной сыворотки к сердечной мышце и 6 серий к скелетным мышцам собак. Изучена динамика синтеза преципитирующих антител против цитохромоксидазы методами Уанье и Оухтерлони. Для определения максимума синтеза антител у иммунизированных кроликов брали кровь из ушной вены на 7—13 сутки



Титры антител методом Уанье.
Штриховая линия — НКС (нормальная кроличья сыворотка), сплошная линия — опытные сыворотки.

Пик образования преципитирующих антител наблюдался нами на 7—9 сутки после последней внутривенной иммунизации.

При изучении количества антител методом Уанье в сыворотке иммунизированных животных добавление различных концентраций цитохромоксидазы (разведения от 1 : 5120, 2510, 1280, 640, 320, 160, 80, 40, 20, 10) создавало оптимальные соотношения для образования комплекса «антиген — антитело» и соответствующее выпадение преципитата. Это выражалось в задержке оптической плотности сыворотки (плато) или даже ее повышении (пик). Контролем служили результаты реакции Уанье, полученные с нормальными кроличьими сыворотками (НКС). При отсутствии антител в НКС наблюдалось постепенное снижение оптической плотности (см. рисунок). Цифровые значения титров опытных серий сывороток в реакции Уанье представлены в табл. 1.

Анализ полученных данных показал, что при выработанной схеме иммунизации титры цитохромоксидазных антител всех серий сывороток были довольно высокими. Для более полной характеристики иммунологических свойств антицитохромоксидазной сыворотки использовали метод иммунодиффузии в агаре по Оухтерлони. Формирование линий преципитации наблюдали уже на следующий день после постановки реакции. Титры преципитирующих антител в различных сериях цитохромоксидазных сывороток приведены в табл. 2. В контрольной серии опытов с пятью нормальными кроличьими сыворотками не выявлено формиро-

вания линий преципитации. Сопоставление метода микропреципитации Уанье с преципитацией в агаре (метод Оухтерлони) позволило установить параллелизм этих двух иммунологических реакций. Наиболее высоким титрам преципитирующих антител, выявленных методом Уанье (серий сывороток № 1, 5, 8, 9, 10, 11, 15) соответствовали и более высокие титры преципитирующих антител в реакциях Оухтерлони. Сопоставление этих данных приведено в табл. 2.

Таблица 1

Титры преципитирующих антител в различных сериях антицитохромоксидазных сывороток (АЦХОС) методом Уанье

Серия сыворотки	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
Титры АЦХОС	1280	640	640	2560	1280	640	640	1280	2560	5120	2560	1280	640

Таблица 2

Титры преципитирующих антител методами Уанье и Оухтерлони

Серия АЦХОС	1	2	3	4	5	6	7
Титр в реакции Уанье	1280	640	640	2560	1280	640	640
Титр в реакции Оухтерлони	64	2	32	512	512	32	64
№ серии АЦХОС	15	16	17	18	19	20	21
Титр в реакции Уанье	1260	2560	320	1280	640	2560	320
Титр в реакции Оухтерлони	16	16	2	8	2	8	2

Серия АЦХОС	8	9	10	11	12	13	14
Титр в реакции Уанье	1280	2560	5120	2560	1280	640	640
Титр в реакции Оухтерлони	128	16	128	32	8	4	4
№ серии АЦХОС	22	23	24	25	26	27	
Титр в реакции Уанье	160	640	2560	640	2560		
Титр в реакции Оухтерлони	цельная	2	8	16	4	16	

В данной работе также проведено сравнительное исследование иммуногенности цитохромоксидаз, полученных из сердечной и скелетных мышц собак. Как показали опыты, цитохромоксидаза, полученная из скелетной мышцы собак, обладает высокой антигенной активностью. Из восьми проиммунизированных кроликов у шести выявлено высокое содержание антител. Изучена динамика синтеза преципитирующих антител против цитохромоксидазы из скелетной мышцы методом Уанье и Оухтерлони. Цифровые данные этих реакций представлены в табл. 3.

У большинства животных на седьмые—девятые сутки после последней иммунизации обнаружены положительные и резко положительные

Таблица 3

Титры преципитирующих антител в различных сериях антицитохромоксидазных сывороток, полученных к скелетной мышце (АМЦХОС)

Серия сыворотки	1	2	3	4	5	6
Титр в реакции Уанье	1:2560	1:2560	1:640	1:320	1:2560	1:1280
Титр в реакции Оухтерлони	1:16	1:16	1:4	1:2	1:16	1:8

результаты реакции Уанье (наличие нескольких подъемов и плато). Наряду с реакцией Уанье был применен метод преципитации по Оухтерлони. Линии преципитации четко фиксировались уже на следующий день после постановки реакции. Как показали экспериментальные наблюдения, наиболее чувствительным серологическим тестом является реакция Уанье, о чем свидетельствуют более высокие титры преципитирующих антител, чем в реакциях Оухтерлони. Сравнительное изучение свойств цитохромоксидазы, полученной из сердечной или скелетной мышц собак, показало их высокую антигенную активность. Однако, оба антигена не проявили выраженной тканевой специфичности. Антисыворотка против цитохромоксидазы, выделенной из сердечной мышцы собак, реагировала в реакции Оухтерлони с цитохромоксидазой, полученной из скелетной мышцы собак. Полученные антитела были высокоспецифичны к цитохромоксидазе, так как цитохром С (контроль) не взаимодействовал с полученными антителами, что было показано в реакции Оухтерлони.

Для проверки на тканевую специфичность полученных сывороток нами для выявления цитотоксических антител была применена реакция связывания комплемента. Титры преципитирующих антител во всех сериях полученных сывороток были выше, чем цитотоксических. В наших экспериментах схема иммунизации способствовала преимущественно выработке преципитирующих антител. Нам удалось установить корреляцию между титрами преципитирующих и цитотоксических антител. Сериям антицитохромоксидазных сывороток с наиболее высокими титрами преципитирующих антител соответствовали и сравнительно высокие титры цитотоксинов (серия № 5, титры преципитинов по реакции Уанье 1 : 5120, в РСК 1 : 800; серия № 9, преципитины 1 : 2560, в РСК — 1 : 400; серия № 17 — Уанье 1 : 320, в РСК — 1 : 160 и т. д.).

Проверка полученных антицитохромоксидазных сывороток на специфичность при перекрестных реакциях с тканевыми антигенами (мышца скелетная, мышца сердечная, почки, легкие, печень, селезенка, семенник) показала, что все полученные нами серии антицитохромоксидазной сыворотки (антиген — цитохромоксидаза из сердечной мышцы) имеют преимущественную специфичность к сердечной цитохромоксидазе. Реакция с собственным антигеном (фермент) была выше и составляла 1 : 160—1 : 800, тогда как с другими антигенами (мышцы сердечные и скелетные, легкие, почки и т. д.) она осуществлялась при более низких разведениях 1 : 10—1 : 320. Цифровые данные серологической характеристики полученных сывороток в РСК представлены в табл. 4, из которой видно, что наивысшие титры антител были отмечены в реакциях с тканями сердца, скелетной мышцы, почки, где активность фермента цитохромоксидазы наиболее высокая. Однако, полученные антитела

Таблица 4

Серологическая характеристика АЦХОС кроликов в перекрестных реакциях связывания комплемента

Серия сыворотки	Титры сывороток с разными антигенами собак							
	фермент	сердце	мышца	почка	легкое	печень	селезенка	семенник
10	1:800	320	200	200	80	100	80	100
4	1:400	320	100	100	80	40	50	—
9	1:400	200	160	160	50	40	40	80
13	1:200	160	100	100	40	20	20	50
7	1:200	160	100	80	40	20	20	—
17	1:160	100	80	80	10	10	10	40
14	1:200	100	100	80	20	20	50	—

были наиболее специфичны к ферменту цитохромоксидазе, тогда как цитохром С не взаимодействовал с полученными антителами, что было показано в реакции Оухтерлони.

Специфичность действия АЦХОС на цитохромоксидазу сердечной и скелетных мышц изучали не только иммунологическими методами, но и биохимическим методом Штрауса. Проведенные эксперименты *in vitro* по ингибированию активности цитохромоксидазы в гомогенате сердечной и скелетной мышц показали, что исследуемые антицитохромоксидазные сыворотки, полученные к цитохромоксидазе сердечной мышцы, обладают высокой ингибирующей способностью по отношению к цитохромоксидазе. Так, максимальное угнетение активности цитохромоксидазы за 5 мин инкубирования гомогената (разведение на фосфатном буфере 0,025 моль, рН 7,6 составляло 1 : 50) с равными объемами разбавленных сывороток при 37°С составляло в сердечной мышце 71%, в скелетной мышце — 61%. Максимальное угнетение активности фермента в селезенке составляет 54%, что представляет статистически достоверное различие в сравнении с максимальным угнетением в сердечной мышце ($p < 0,01$). Результаты представлены в табл. 5, статистическая достоверность рассчитана по методу Манцевичюте-Эрингене [9]. Как показали биохимические исследования, ингибирование цитохромоксидазы вызывается преимущественно преципитирующими антителами, так как добавление комплемента морской свинки не влияет существенно на процент ингибирования активности фермента.

Особый интерес представляли проведенные в нашей лаборатории опыты по введению полученных антицитохромоксидазных сывороток собакам для разработки новой модели инфаркта миокарда. Испытание было проведено на 37 собаках, которым сыворотку вводили по 2 мл/кг внутривенно. Наиболее активными по моделированию инфаркта миокарда у собак оказались сыворотки, содержащие высокие титры преципитирующих антител (№ 1, 4, 8 и др.). В большинстве опытов была отмечена корреляция между титрами преципитирующих антител, содержащихся в антицитохромоксидазных сыворотках, и их биологической эффективностью. Но нельзя не учитывать и индивидуальную чувствительность отдельных собак. Так, при введении сыворотки серии № 1 двум собакам (№ 2 и № 4), у собаки № 4 был обнаружен инфаркт миокарда, а у собаки № 2 изменения в миокарде носили обратимый характер. Вследствие введения сыворотки у собак возникали выраженные нарушения дыхания и сердечной деятельности, подтверждаемые данными электрокардиограммы (Е. Б. Грибок), дыхания и артериального

Таблица 5

Ингибирование активности цитохромоксидазы в сердечной, скелетной мышцах и селезенке собак антицитохромоксидазными сыворотками, полученными к цитохромоксидазе из сердечной мышцы (активность цитохромоксидазы—в индофенольных единицах на 1 мг белка), 5 мин, 37° С

Ткань без сыворотки (контроль)	Разведения сыворотки							
	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128	1:256
Сердечная мышца								
<i>M</i> 0,79	0,23	0,24	0,30	0,43	0,53	0,56	0,60	0,65
$\pm m$ 0,164	$\pm 0,033$	$\pm 0,03$	$\pm 0,035$	$\pm 0,073$	$\pm 0,114$	$\pm 0,111$	$\pm 0,111$	$\pm 0,099$
<i>n</i> 6	6	6	6	6	6	6	6	6
<i>p</i>	>0,006	>0,005	>0,01	<0,08				
% ингибирования	71	70	62	45	33	29	24	18
Скелетная мышца								
<i>M</i> 0,51	0,20	0,20	0,21	0,25	0,30	0,35	0,41	0,46
$\pm m$ 0,049	$\pm 0,018$	$\pm 0,027$	$\pm 0,034$	$\pm 0,019$	$\pm 0,042$	$\pm 0,036$	$\pm 0,036$	$\pm 0,036$
<i>n</i> 6	6	6	6	6	6	6	6	6
<i>p</i>	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,009	>0,03	>0,13	>0,44
% ингибирования	61	61	59	51	41	31	20	10
Селезенка								
<i>M</i> 0,083	0,048	0,044	0,038	0,039	0,052	0,059	0,072	
$\pm m$ 0,013	$\pm 0,005$	$\pm 0,005$	$\pm 0,008$	$\pm 0,008$	$\pm 0,010$	$\pm 0,012$	$\pm 0,012$	
<i>n</i> 4	4	4	4	4	4	4	4	
<i>p</i>	>0,05	<0,03	>0,02	<0,03	>0,1			
% ингибирования	42	47	54	53	37	29	13	

давления (Ю. Н. Королев). Биохимические исследования сердец, взятых от забытых в различные сроки после введения сыворотки животных, указывают на значительное нарушение скорости потребления кислорода миокардом, разобщение дыхания с фосфорилированием (А. Г. Хмелько).

Таким образом, сыворотка, полученная к цитохромоксидазе сердечной мышцы, в отличие от существующих кардиоцитотоксических и митохондриальных сывороток, позволяет направленно ингибировать активность цитохромоксидазы, нарушать скорость потребления кислорода сердечной тканью, снижать энергетический обмен в миокарде, что позволяет моделировать острую ишемию миокарда.

Выводы

1. Цитохромоксидаза, полученная из сердечной или скелетной мышцы собак по методу Окунуки, вызывает выраженный иммунологический ответ у кроликов с синтезом антицитохромоксидазных антител.
2. Предложенная схема иммунизации способствует преимущественно выработке преципитирующих антител.

3. Полученные антитела высокоспецифичны к цитохромоксидазе сердца и обладают относительной специфичностью к цитохромоксидазе скелетных мышц.

4. Антицитохромоксидазная сыворотка может быть использована для разработки новой модели инфаркта миокарда с использованием цитохромоксидазных антител.

Литература

1. Антоненко В. Т. Кардиоцитотоксины и моделирование нейрогенноаллергического инфаркта миокарда.— Цитотоксины в современной медицине. К., «Здоров'я», 1966, 3, с. 162—168.
2. Антоненко В. Т., Козачук Ю. С. Влияние антидистрофомитохондриальной сыворотки на функциональное состояние сердца.— Цитотоксины в современной медицине. К., «Здоров'я», 1967, с. 194—199.
3. Антоненко В. Т. Роль нейротрофического и аутоаллергического факторов в патогенезе инфаркта миокарда. Автореф. докт. дис. К., 1968. 25 с.
4. Вульфсон В. Л., Козлова Н. Б., Кулунди Э. К. Иммунологические свойства нативной и модифицированной фосфорилазы.— Биохимия, 1974, 39, № 2, с. 367—369.
5. Гитис Е. М., Казакевич Р. Л., Коврикова Н. П., Муравова Л. П. Использование модифицированной реакции Уанье для выявления циркулирующих антител.— Врачебн. дело, 1974, № 4, с. 136—139.
6. Горев Н. Н., Бутенко Г. М. Роль иммунологических факторов в патогенезе поражения сердца.— В кн.: Актуальные проблемы терапии. Киев, 1976, с. 130—131.
7. Коншина И. З., Кашкин А. П. Изучение динамики синтеза антител против протеолитических ферментов.— Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол., 1976, № 5, с. 113—115.
8. Король С. А. Характеристика цитотоксических сывороток против митохондрий сердца крыс разных возрастов.— Цитотоксины в современной медицине. К., «Здоров'я», 1967, с. 102—107.
9. Манцевичюте-Эрингене Е. В. Упрощенные математико-статистические методы в медицинской исследовательской работе.— Патол. физиол. и эксперим. терапия, 1964, № 4, с. 71—78.
10. Мойбенко А. А., Вышатица А. И., Грабовский Л. А., Сагац В. Ф. Сердечный и сосудистый компоненты в патогенезе цитотоксического кардиогенного шока.— В кн.: Механизмы повреждения, резистентности, адаптации и компенсации. Киев, 1976, 3, с. 404—405.
11. Окунуки К. Цитохромы из сердечной мышцы крупного рогатого скота.— Аналитические методы белковой химии. М., 1963, с. 37—39.
12. Оухтерлони К. Antigen—antibody reaction in gels.— Acta pathol. microbiol., 1953, 32, p. 231.
13. Askari A. The effects of antibodies to Na^+ , K^+ —ATPase on the reactions catalyzed by the enzyme.— Ann. N. Y. Acad. Sci., 1974, 242, p. 343—354.
14. Lowry O. H., Rosenbrough N. J., Farr A. L., Randall R. J. Protein measurement with the Folin phenol reagent.— J. Biol. Chem., 1951, 193, p. 265—275.
15. Meisler M., Rattassi M. I. Immunological studies of galactosidase in normal human liver and gml-gangliosidosis.— Amer. J. Hum. Genet., 1974, 26, N 6, p. 683—692.
16. Mockett B. S., Long R. W., Elliott W. B. Studies on a cytochrome oxidase antibody.— Biochim. et biophys. acta, 1970, 216, p. 96—121.
17. Peterson R. J., Handschumacher R. E. Immunological responses to α -asporaginase.— J. Clin. Invest., 1971, 50, N 5, p. 1080—1090.
18. Reichlin M., Fogel S. Antibodies against cytochromes C from vertebrates.— J. Biol. Chem., 1966, 187, N 2, p. 251—253.
19. Smith L., Solts E. Purification of cytochrome C oxidase.— J. Biol. Chem., 1954, 209, N 2, p. 819—821.
20. Straus W. Colorimetric microdetermination of cytochrome—c—oxidase.— J. Biol. Chem., 1954, 207, p. 733—743.
21. Vanneste W. H., Ysebaert—Vanneste M. M., Mason H. S. The decline of molecular activity of cytochrome oxidase during purification.— J. Biol. Chem., 1974, 249, N 23, p. 7390—7401.

Киевский институт
усовершенствования врачей

Поступила в редакцию
23.XI 1977 г.