

## Одержання фактора переносу гіперчутливості сповільненого типу морських свинок до антигенних субстанцій *Staphylococcus aureus*

*Изучали иммуноактивирующие эффекты стафилококкового фактора переноса (ФП) морских свинок на иммунокомпетентные клетки в гомологичной и гетерологичной (лейкоциты человека) системах. В тестах in vivo (кожные пробы) и in vitro (реакция ингибции миграции лейкоцитов) выявлена способность ФП активировать как интактные, так и сенсibilизированные клетки. Показаны антигенспецифические свойства ФП.*

### Вступ

Фактор переносу (ФП) застосовується як терапевтичний препарат при лікуванні людей з різними вродженими та набутими патологіями, які супроводжуються порушеннями функцій імунної системи (імунодефіцити, бактеріальні, вірусні та грибкові інфекції, злоякісні захворювання тощо). ФП - це діалізабельний компонент лізату імунних клітин, що переносить стан гіперчутливості сповільненого типу (ГСТ) реципієнтам з попередньо негативними шкірними пробами [15]. Нині він класифікується як речовина (речовини), що продукується лімфоцитами-хелперами CD4 специфічно чутливих донорів [7, 9]. Останнім часом з'явилися аргументовані праці, в яких вказана можлива природа та структурні формули ФП [6, 16, 18]. Активна молекула ФП - це олігорибонуклеопептид з молекулярною масою 1-3 кДа, що має у своєму складі 5'3'-фосфодіестерні зв'язки, 5' - кінець приєднаний до N-кінцевого пептиду. Основне джерело одержання ФП - діалізований безклітинний екстракт лейкоцитів (ДЕЛ), одержаний за методом Lawgense [13]. У 1970 р. ФП був вперше застосований для лікування хворих з широким спектром імунологічних дефектів [1].

Метою нашої роботи було одержання, тестування, стандартизація та відпрацювання на тваринній моделі препаратів ФП до антигенних субстанцій стафілокока. Ці препарати можуть розширити можливості лікування стафілокової інфекції в клініці.

### Методика

Експерименти проведені на нелінійних морських свинках масою 350-450 г, одержаних з віварію НДІ фізіології при Київському університеті ім. Тараса Шевченка. Тварини одержували стандартний харчовий раціон. В досліджах були використані такі штами стафілокока: *Staphylococcus aureus* Cowan-1 (2352), що є стандартним продуцентом білка А; *Staphylococcus aureus* Wood-46 (2351), що не продукує білок А (обидва штами з Чехословацької колекції мікроорганізмів). Викори-

стовували антиген КАС Wood-46), при 85-90 °С пр клітин/мл; клітин як описано раніше в подушечку клітин/мл або 1 у суміші (1:1), (Швеція).

Стан ГСТ в дозу антигену 1 мкг/тварина місцевих реакцій введення антигену ізотонічний розчин одержані препаратом дикою Lawgense дифікації [3, 17] селезінки, тимуліну рин. Клітини в процесі заморожування посилення гідролізу азоту та сіль Mg<sup>2+</sup> жаний екстракт проти бідистильованої води за допомогою обдування з критеріями: Міжнародну одиницю фільтри (d=0,21 мкм) глинянням в УС-1 камері. Одержані препарати камері.

Стан ГСТ переносим. ФП вводили через дозу антигену яристовували ризистивний тест) рози, розроблений до цього тесту клітин селезінки зробленим David

Результати та їх Згідно з Lawgense діалізованих екстрактів інтенсивні шкіря

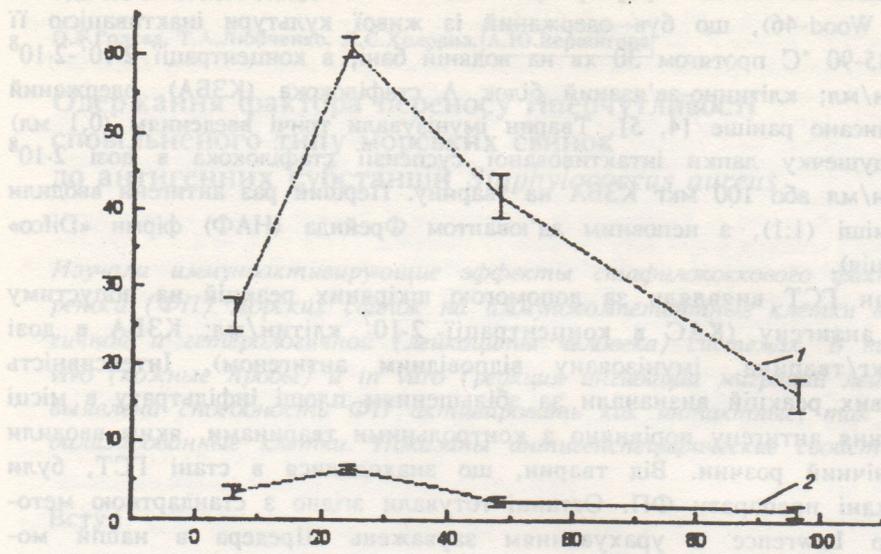
стовували антигени: корпускулярний антиген стафілокока (КАС Cowan-1; КАС Wood-46), що був одержаний із живої культури інактивацією її при 85-90 °С протягом 30 хв на водяній бані, в концентрації  $2 \cdot 10^7$ - $2 \cdot 10^8$  клітин/мл; клітинно-зв'язаний білок А стафілокока (КЗБА), одержаний як описано раніше [4, 5]. Тварин імунізували тричі введенням (0,1 мл) в подушечку лапки інтактивованої суспензії стафілокока в дозі  $2 \cdot 10^8$  клітин/мл або 100 мкг КЗБА на тварину. Перший раз антигени вводили у суміші (1:1), з неповним ад'ювантом Фрейнда (НАФ) фірми «Difco» (Швеція).

Стан ГСТ виявляли за допомогою шкіряних реакцій на допустиму дозу антигену (КАС в концентрації  $2 \cdot 10^7$  клітин/мл; КЗБА в дозі 1 мкг/тварина, імунізовану відповідним антигеном). Інтенсивність місцевих реакцій визначали за збільшенням площі інфільтрату в місці введення антигену порівняно з контрольними тваринами, яким вводили ізотонічний розчин. Від тварин, що знаходилися в стані ГСТ, були одержані препарати ФП. Останні готували згідно з стандартною методикою Lawrence з урахуванням зауважень Шредера в нашій модифікації [3, 17]. Препарати одержували з лейкоцитарної маси крові, селезінки, тимуса, регіонарних лімфатичних вузлів імунізованих тварин. Клітини в суспензії руйнували десятикратним заморожуванням - розморожуванням при температурі -4 °С і 37 °С відповідно. Для посилення гідролізу після руйнування клітин в екстракт додавали ДНК-азу та сіль  $Mg^{2+}$  і витримували 30 хв при 37 °С у термостаті. Одержаний екстракт діалізували протягом доби при 4 °С. Діаліз проводили проти бідистильованої апірогенної води. Діалізат концентрували за допомогою обдування при 4 °С. Препарати ФП стандартизували згідно з критеріями: враховували, що з  $5 \cdot 10^8$  лейкоцитів одержують 1 Міжнародну одиницю (МО) ФП [12]; екстракти були пропущені через фільтри ( $d=0,21$  мкм) та стандартизовані спектрофотометрично за поглинанням в УФ світлі при довжині хвиль 260 і 280 нм відповідно. Одержані препарати були заампульовані та зберігалися в морозильній камері.

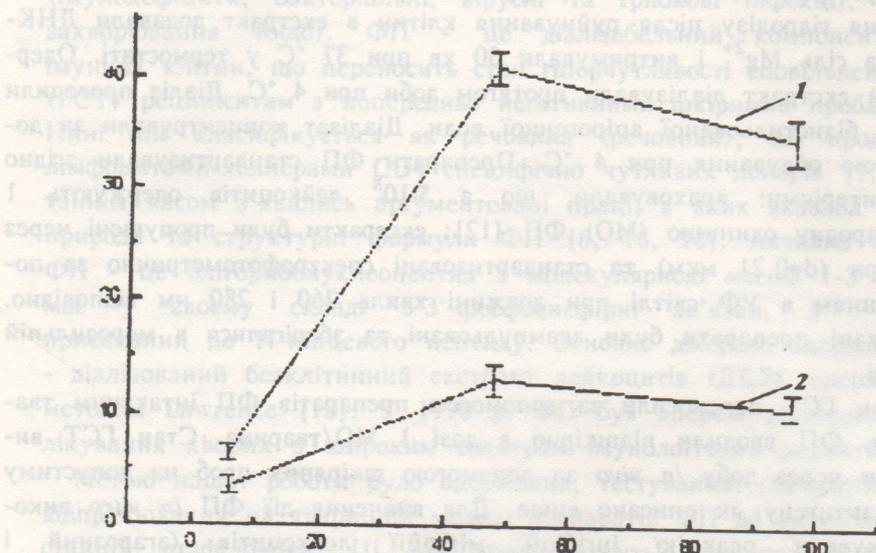
Стан ГСТ переносили за допомогою препаратів ФП інтактним тваринам. ФП вводили підшкірно в дозі 1 МО/тварина. Стан ГСТ виявляли через добу *in vivo* за допомогою шкіряних проб на допустиму дозу антигену як описано вище. Для вивчення дії ФП *in vitro* використовували реакцію інгібіції міграції лейкоцитів (агарозний і капілярний тест). Застосовували метод інгібіції міграції під шаром агарози, розроблений Hoffman [11]. У дослідженні враховували зауваження до цього тесту Fudenberg з співавт. [10]. Реакція інгібіції міграції клітин селезінки (капілярний тест) була поставлена за методом, розробленим David [8] у модифікації Сулова, Черноусова [2].

#### Результати та їх обговорення

Згідно з Lawrence [14], ФП є субстанцією, що знаходиться в діалізованих екстрактах лейкоцитів донорів, у яких відмічались інтенсивні шкіряні реакції ГСТ до антигену, яким вони були сен-

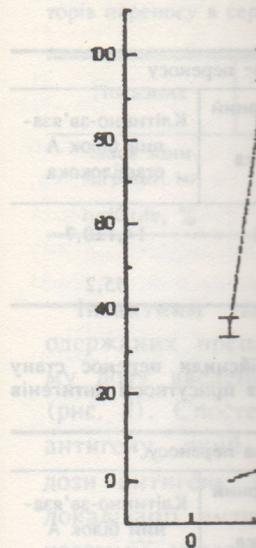


а



б

Рис. 1. Шкіряні реакції на тест-ін'єкцію (а) корпускулярного антигену стафілокока *Staphylococcus aureus* Cowan-1; корпускулярного антигену стафілокока *Staphylococcus aureus* Wood-46 (б); клітинно-зв'язаного білку А стафілокака (в) у сенсibilізованих гомологічним антигеном тварин (1 - дослід, 2 - контроль). Тут і на рис. 2 по осі абсцис - строк після індукуючого введення антигену, год; по осі ординат - розмір інфільтрату у морських свинок, мм<sup>2</sup>.



Закінчення рис. 1.

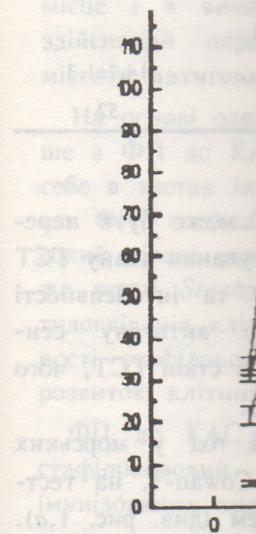
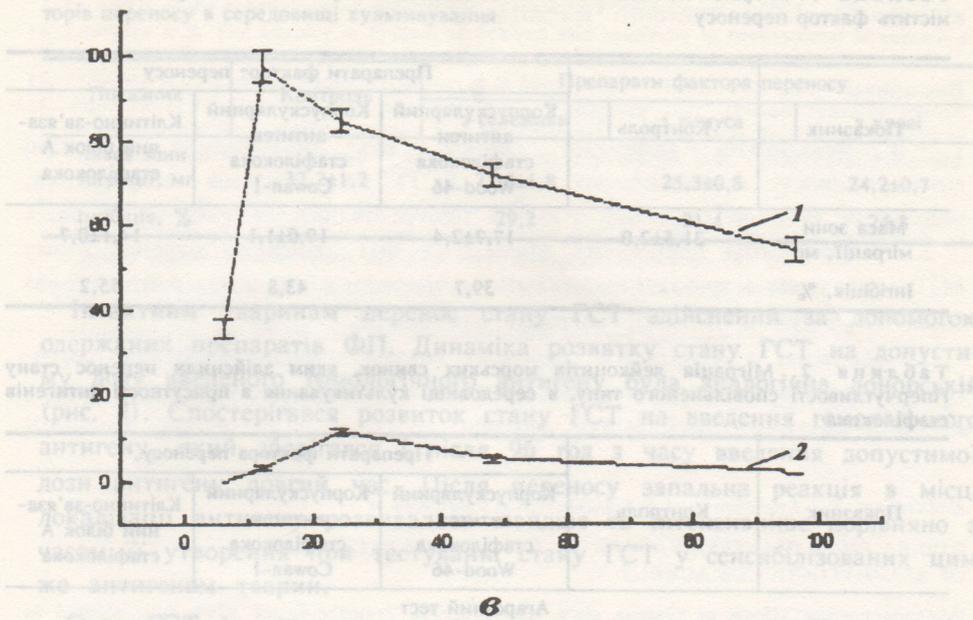


Рис. 2. Шкіряні реакції переносу тварин (1 - дослід, 2 - контроль) стафілокока *Staphylococcus aureus* Wood-46.



Закінчення рис. 1.

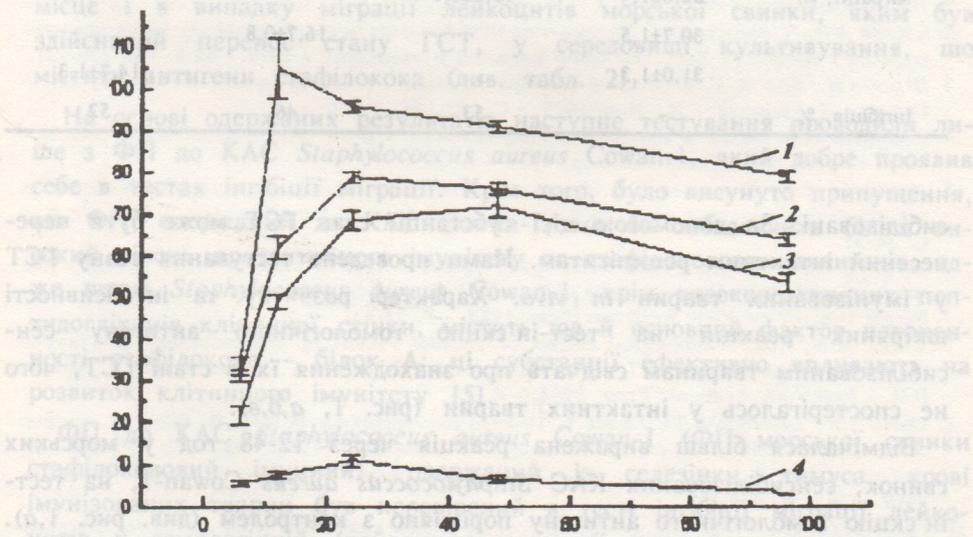


Рис. 2. Шкіряні реакції на тест-ін'єкцію антигену у сенсibilізованих гомологічним фактором переносу тварин (1 - клітинно-зв'язаний білок А стафілокока; 2 - корпускулярний антиген стафілокока *Staphylococcus aureus* Cowan-1; 3 - корпускулярний антиген стафілокока *Staphylococcus aureus* Wood-46; 4 - контроль).

Таблиця 1. Міграція лейкоцитів несенсибілізованих морських свинок у середовищі, що містить фактор переносу

Показник	Контроль	Препарати фактору переносу		
		Корпускулярний антиген стафілокока Wood-46	Корпускулярний антиген стафілокока Cowan-1	Клітинно-зв'язаний білок А стафілокока
Маса зони міграції, мг	31,5±2,0	17,7±2,4	19,0±1,1	14,1±0,7
Інгібіція, %	-	39,7	43,8	55,2

Таблиця 2. Міграція лейкоцитів морських свинок, яким здійснили перенос стану гіперчутливості сповільненого типу, в середовищі культивування в присутності антигенів стафілокока

Показник	Контроль	Препарати фактора переносу		
		Корпускулярний антиген стафілокока Wood-46	Корпускулярний антиген стафілокока Cowan-1	Клітинно-зв'язаний білок А стафілокока
Агарозний тест				
Маса зони міграції, мг	40,5±1,1	24,6±1,1		
	42,6±4,5		26,0±1,4	
	41,6±1,5			28,0±2,5
Інгібіція, %	-	39	38	33
Капілярний тест				
Маса зони міграції, мг	32,0±1,4	15,0±0,7		
	30,7±1,5		16,7±0,8	
	31,0±1,3			14,7±1,3
Інгібіція, %	-	53	46	52

сенсибілізовані. За допомогою цієї субстанції стан ГСТ може бути перенесений інтактним реципієнтам. Нами проведено тестування стану ГСТ у імунізованих тварин *in vivo*. Характер розвитку та інтенсивності шкіряних реакцій на тест-ін'єкцію гомологічного антигену сенсибілізованим тваринам свідчать про знаходження їх в стані ГСТ, чого не спостерігалось у інтактних тварин (рис. 1, а, б, в).

Відмічалася більш виражена реакція через 12-48 год у морських свинок, сенсибілізованих КАС *Staphylococcus aureus* Cowan-1, на тест-ін'єкцію гомологічного антигену порівняно з контролем (див. рис. 1, а). У морських свинок, сенсибілізованих КАС *Staphylococcus aureus* Wood-46, при введенні антигену через 48-96 год спостерігалася найбільш виражена реакція (див. рис. 1, б). У тварин, сенсибілізованих КЗБА, при введенні допустимої дози гомологічного антигену, запальна реакція була достатньо вираженою вже через 12 год (див. рис. 1, в).

Таблиця 3. Міграція лейкоцитів у середовищі, що містить фактор переносу в середовищі

Показник
Маса зони міграції, мг
Інгібіція, %

Інтактним тваринам, одержаним препаратом ФП, дозу введення антигену (рис. 2). Спостерігалось, що дози антигену до локалізації антигену часом її утворення, яке утворюється антигеном тварини.

Стан ГСТ *in vivo* лейкоцитів під шкірою свинки капілярний тест у тестах *in vivo* порівняно з контролем антигенів стафілокока свинки значно інтенсивніше одержаних препаратом ФП місце і в випадку здійсненого перенесення містить антигени.

На основі одержаних даних з ФП до КАС себе в тестах інтенсивніше ФП, одержаних препаратом ФП, сокий рівень проявляє штамп *Staphylococcus aureus* тидогліканів клітинності стафілокока розвитку клітинності.

ФП до КАС стафілококовий імунізованих тварин у гомологічних системах (лейкоцитів) міграції інтактних препаратом ФП з метою для препаратом ФП гомологічної системи.

Таблиця 3. Міграція інтактних людських лейкоцитів у присутності гетерологічних факторів переносу в середовищі культивування

Показник	Контроль	Препарати фактора переносу		
		з селезінки	з тимуса	з крові
Маса зони міграції, мг	32,2±1,2	22,8±1,8	25,3±0,6	24,2±0,7
Інгібіція, %	-	29,2	21,4	24,8

Інтактним тваринам перенос стану ГСТ здійснений за допомогою одержаних препаратів ФП. Динаміка розвитку стану ГСТ на допустимому дозу введеного гомологічного антигену була аналогічна донорській (рис. 2). Спостерігався розвиток стану ГСТ на введення гомологічного антигену, який зберігався і після 96 год з часу введення допустимої дози антигену довгий час. Після переносу запальна реакція в місці локалізації антигену розвивалася швидше та інтенсивніше порівняно з часом її утворення при тестуванні стану ГСТ у сенсibilізованих цим же антигеном тварин.

Стан ГСТ *in vitro* визначали за допомогою тестів інгібіції міграції лейкоцитів під шаром агарози та інгібіції міграції спленоцитів морської свинки капілярним методом. Як видно з одержаних результатів, у тестах *in vitro* мав місце значний відсоток інгібіції міграції порівняно з контролем (табл. 1, 2). У середовищі, що містить ФП до антигенів стафілокока, міграція лейкоцитів несенсibilізованих морських свинок значно інгібувалася (див. табл. 1), що свідчить про активність одержаних препаратів ФП. Підвищені індекси інгібіції міграції мали місце і в випадку міграції лейкоцитів морської свинки, яким був здійснений перенос стану ГСТ, у середовищі культивування, що містить антигени стафілокока (див. табл. 2).

На основі одержаних результатів наступне тестування проводили лише з ФП до КАС *Staphylococcus aureus* Cowan-1, який добре проявив себе в тестах інгібіції міграції. Крім того, було висунуто припущення, що ФП, одержаний до КАС Cowan-1, міг би забезпечити більш високий рівень протективного імунітету до стафілококових антигенів, адже штам *Staphylococcus aureus* Cowan-1, крім високореактивних пептидогліканів клітинної стінки, містить ще й основний фактор патогенності стафілокока - білок А; ці субстанції ефективно впливають на розвиток клітинного імунітету [5].

ФП до КАС *Staphylococcus aureus* Cowan-1 (ФП морської свинки стафілококовий імунний), одержаний із селезінки, тимуса, крові імунізованих тварин був перевірений в тесті інгібіції міграції лейкоцитів у гомологічній (лейкоцити морської свинки) та гетерологічній системах (лейкоцити людини). Під дією гомологічного ФП індекси міграції інтактних лейкоцитів морської свинки становили 47 % для препарату ФП з селезінки, 34 % для препарату ФП з тимуса, 37 % для препарату ФП, одержаного з крові сенсibilізованих тварин. У гомологічній системі відсоток інгібіції міграції перевищував такий в ге-

терологічній системі (табл. 3). Усі препарати показали статистично вірогідні значення інгібіції міграції.

#### Висновки

1. З лейкоцитів морських свинок, що знаходилися в стані гіперчутливості сповільненого типу (ГСТ) до антигенів стафілокока, виділений Фактор переносу (ФП) і протестований *in vivo* та *in vitro*.

2. З допомогою одержаних препаратів ФП здійснено перенос стану ГСТ інтактним морським свинкам, що підтверджується шкіряними пробами та тестами інгібіції міграції лейкоцитів.

3. Одержані з лейкомаси морських свинок препарати ФП до антигенів стафілокока проявляють активність у гомологічній та гетерологічній системах (лейкоцити людини).

E.G.Goleva, T.A.Lyubchenko, L.S.Kholodna, A.E.Vershigora

#### GUINEA PIG'S TRANSFER FACTOR TO ANTIGENE SUBSTANCES OF STAPHYLOCOCCUS AUREUS

Immunoactivating effects of Guinea pig's staphylococcal Transfer factor (TF) were studied in homologous and heterologous (human leucocytes) systems. *In vivo* (skin tests) and *in vitro* (inhibition of leucocytes migration) tests showed that our TF is able to activate intact as well as sensitized cells. Antigenespecific properties of TF also were showed.

Taras Shevchenko University,  
Ministry of Education of Ukraine, Kiev

#### СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. *Иммунологическая инженерия* / Под ред. Д.Джирша. - М.: Медицина, 1982. - 278 с.
2. Сулов А.П., Черноусов А.Д. Упрощенная модификация метода подавления миграции макрофагов у мышей // Бюл. эксперим. биологии и медицины. - 1979. - № 8. - С. 236-237.
3. Шредер И., Лоренц У. Выделение фактора переноса. - В кн.: Иммунологические методы / Под ред. Х.Фримеля. - М.: Мир, 1979. - С. 187-194.
4. Холодная Л.С. Белок А золотистого стафилококка. - В кн.: Иммунологическая реактивность в патологии. - Киев-Винница, 1979. - С. 304.
5. Холодная Л.С., Хоробрых В.В., Голованова Т.А., Каулен Д.Р., Вершигора А.Е. Влияние антигенов стафилококка на первичный иммунный ответ // Иммунология. - 1981. - № 6. - С. 34-37.
6. Burger D.R., Vandenberg A.A., Vetto R.M., Klesius P. Human Transfer Factor: specificity and structural models. In: Immunobiology of Transfer Factor / Eds. Kirkpatrick C.H., Lawrence H.S., Burger D.R. - New-York: Academic Press, 1983. - P. 33-42.
7. Chase M.W. The immunological enigma of Transfer Factor. In: Immunobiology of Transfer Factor. In: Immunobiology of Transfer Factor / Eds. Kirkpatrick C.H., Lawrence H.S., Burger D.R. - New-York: Academic Press, 1983. - P. 3.
8. David J.R., Lawrence H.T., Thoms L. Delayed hypersensitivity *in vitro*. II. Effect of sensitive cells on normal cells in the presence of antigen // J.Immunol. - 1964. - 93, № 2. - P. 264-278.
9. Fudenberg H.H. Transfer Factor. Past. Present and Future / Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol. - 1989. - 29. - P. 475-516.
10. Fudenberg H.H., Wilson G.B., Keller R.H. et al. Clinical applications of the Leucocyte Migration Inhibition Assay - new methods for determining Transfer Factor potency and for predicting clinical response. In: Immunobiology of Transfer Factor / Eds. Kirkpatrick C.H., Lawrence H.S., Burger D.R. - New-York: Academic Press, 1983. - P. 293-311.
11. Hoffman P.V., Sputler Z.E., Hsu M., Fudenberg H.H. Leucocyte migration inhibition in agarose // Cell Immunol. - 1975. - 18. - P. 21-30.
12. Immunobiology of Transfer Factor / Eds. Kirkpatrick C.H., Lawrence H.S., Burger D.R. - New-York: Academic Press, 1983. - 386 p.

13. Lawrence H.S. The transfer factor by means of the constant component and to tuberculin with tuberculin transfer factor. - P. 51-52.
14. Lawrence H.S. The transfer factor by means of the constant component and to tuberculin with tuberculin transfer factor. - P. 51-52.
15. Lawrence H.S. Transfer Factor. - P. 51-52.
16. Paddock G.V., Wilson G.B. Exogenous labelling of transfer factor. - P. 51-52.
17. Vershigora A.E., Lyubchenko T.A. Lymphocyte mediated immunity to transfer factor. Abstracts of the 1st International Conference on Transfer Factor. - P. 51-52.
18. Wilson G.B., Paddock G.V. Transfer Factor activity and responsiveness can be measured. - P. 51-52.

Київ. ун-т ім. Тараса Шевченка  
М-ва освіти України

13. Lawrence H.S. The transfer of generalized hypersensitivity of the delayed tuberculin type in man by means of the constituents of disrupted leucocytes // *J. Clin. Invest.* - 1954. - 33. - P. 951.
14. Lawrence H.S. The transfer in humans of delayed skin sensitivity to streptococcal M substance and to tuberculin with disrupted leucocytes // *J. Clin. Invest.* - 1955. - 34. - P. 219.
15. Lawrence H.S. Transfer Factor // *Advances in Immunology.* - 1969. - 11. - P. 36.
16. Paddock G.V., Wilson G.B., Williams A.M., Fudenberg H.H. Human Transfer Factor: exogenous labelling, purification and role of ribonucleic acid segment. In: *Immunobiology of Transfer Factor* / Eds. Kirkpatrick C.H., Lawrence H.S., Burger D.R. - New-York: Academic Press, 1983. - P. 51-63.
17. Verzhigora A.E., Lyubchenko T.A., Goleva E.G. et al. Human specific transfer factor of cell-mediated immunity to Staphylococcus antigen substances // X-th International Symposium on Transfer Factor. Abstract Book (22-24th June, Bologna, 1995). - P. 14.
18. Wilson G.B., Paddock G.V., Fudenberg H.H. Effects of dialysable leucocyte extracts with Transfer Factor activity on leucocyte migration in vitro. J. Antigen-specific lymphocyte responsiveness can be initiated by two structurally distinct polyribonucleotides // *Thymus.* - 1981. - № 2. - P. 257-276.

Київ. ун-т ім. Тараса Шевченка  
М-ва освіти України

Матеріал надійшов  
до редакції 22.03.96