

Людський специфічний Фактор переносу до антигенів *Staphylococcus aureus*

В работе изучались иммунобиологические свойства человеческого Фактора переноса (ФП) к антигенам *Staphylococcus aureus*. Установлено активирующее действие ФП на человеческие лейкоциты (*in vitro*) и на лейкоциты сенсibilизированных стафилококком морских свинок (*in vivo* и *in vitro*). Показана антигенспецифичность иммуноактивирующих эффектов ФП. *In vitro* использовались тесты ингибиции миграции лейкоцитов (ИМЛ) и макрофагов (МИФ), розеткообразование (Е-РОК). Для тестирования *in vivo* использовались кожные пробы состояния гиперчувствительности замедленного типа (ГЗТ).

Вступ

Фактор переносу (ФП) — це субстанція олігорибонуклеопептидної природи з молекулярною масою 3-6 кДа. Ця речовина не є антигеном, вона нетоксична для організму [12]. Критерієм ідентифікації ФП за Lawrence [16] є перенос стану гіперчутливості сповільненого типу (ГСТ) від імунного організму до неімунного, який визначають за допомогою шкіряних проб. Відомо, що ФП буває ефективним при лікуванні різних уроджених і набутих патологічних станів, що супроводжуються порушеннями функцій імунної системи (імунодефіцити, бактеріальні, вірусні та грибові інфекції, злоякісні пухлини тощо) [1, 15]. Нині за кордоном випускають медичні препарати лейкоцитарних ультрафільтратів з активністю ФП, які одержують з лейкоцитарної маси людини, а також з лімфоїдної тканини та молозива імунізованих тварин [6, 25]. ФП антигенспецифічний. Він продукується сенсibilізованими Т-хелперами при наявності антигену. До складу ФП входять нуклеотиди (пурини чи піримідини) та 6—8 амінокислот. При руйнуванні нуклеотид-пептидного зв'язку його активність втрачається [8, 11, 17]. ФП не є видоспецифічним. Про це, зокрема, свідчать дані про перенос остеосаркомоспецифічного клітинно-опосередкованого імунітету хом'ячкам за допомогою кролячого ФП [22].

При введенні в інтактний організм тварини чи людини ФП викликає антигенспецифічні шкіряні реакції ГСТ і реакції клітинного імунітету: посилює продукцію фактора інгібіції міграції макрофагів (МИФ) [12, 13], розеткоутворення [19, 20] тощо. ФП проявляє також ад'ювантну активність [3]; одержаний від хворих на СНІД, інгібує зворотну транскриптазу цього вірусу і, не впливаючи на його адсорбцію, знижує репродукцію такого в клітині [21].

Серед основних компонентів, що входять до складу ФП, виділяють: фактор(и), що ініціюють *de novo* специфічний клітинно-опосередкований імунітет (КОІ) *in vitro* та *in vivo*. Саме цю субстанцію і нази-

вають ФП; фактор(и), що підсилюють вже існуючі в організмі специфічні імунні реакції; інші імуноактивні субстанції, що інгібують вище названу активність [15, 18, 26].

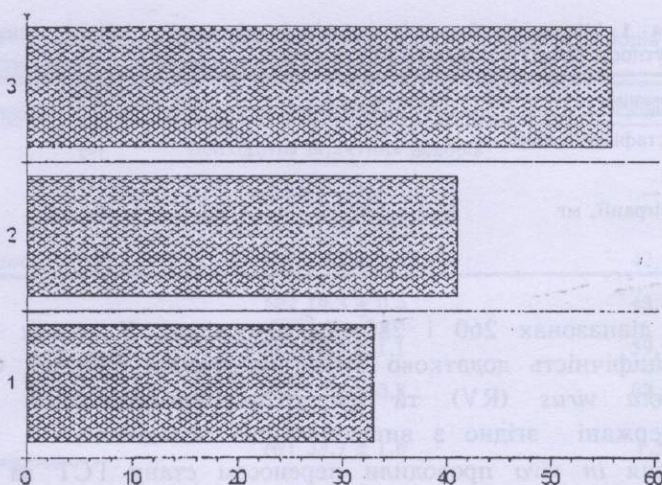
Сьогодні ФП класифікується як субстанція, що продукується лімфоцитами-хелперами (CD4+) специфічно чутливих донорів [7]. На жаль, подальші (після повідомлення Lawrence про цей феномен) дослідження ФП, зокрема його клінічного використання, йшли несистематично, без узагальнення статистичних даних, з використанням різних методів лікування, ідентифікації та тестування застосовуваних препаратів. Значна частина публікацій на цю тему була лише описом конкретних клінічних випадків застосування препарату без спроб з'ясування його природи та можливих механізмів дії. Фундаментальних праць було недостатньо [8, 11, 15, 24]. Існувала також проблема підбору та правильного використання препаратів ФП: одні дослідники застосовували аутологічний препарат, другі - від сенсibilізованих донорів (людей та тварин), треті - від несенсибилізованих донорів (ад'ювантний препарат). Позитивний терапевтичний ефект інколи було важко оцінити через запущеність хвороби. Крім того, деякі хворі одночасно одержували інші види лікування.

Сьогодні можна сказати, що основним критерієм успішного використання ФП у клініці є комплексна діагностика стану хворого, яка включає в себе: а — оцінку імунного статусу хворого; б — правильний підбір донора ФП (людина чи тварина); в — застосування аутологічного препарату або ж препарату, одержаного з культури клітин-продуцентів; г — специфічність ФП; д — об'єднання ФП-терапії з іншими методами лікування (наприклад при онкологічних захворюваннях найбільший ефект спостерігається на ранніх стадіях розвитку пухлини, а також у тих випадках, коли первинна пухлина видалена хірургічним шляхом); е — підбір дози, способу та строків введення препарату (завдяки своїй нетоксичності та неімуногенності ФП може використовуватись у великих дозах; препарат стійкий до дії ферментів травного тракту, тому може застосовуватися перорально).

Метою нашої роботи було одержання та вивчення імунобіологічних властивостей ФП. За основу був взятий ФП до антигенів стафілокока, оскільки згідно з літературними даними ФП саме до цих антигенів виявився найменш вивченим [23]. Крім того, існує перспектива подальшого використання такого препарату в клініці для посилення протистафілококового імунітету (зокрема при хронічних інфекціях тощо).

Методика

У досліджах використані такі антигени: 1) корпускулярний антиген стафілокока штамів *Staphylococcus aureus* Cowan-1 (2352), що є стандартним продуцентом білка А, та *Staphylococcus aureus* Wood-46 (2351), що не продукує білок А, (КАС Cowan-1; КАС Wood-46). Обидва штами одержані з Чехословацької колекції мікроорганізмів. Культури стафілокока вирощували на м'ясо-пептонному агарі (МПА) при 37 °С упродовж 24 год. Клітини відмивали ізотонічним розчином,



Е-розеткоутворення лімфоцитів інтактних донорів (1) та оброблених гомологічним діалізованим екстрактом лейкоцитів (2) чи Фактором переносу до стафілококового анатоксину (3). По осі абсцис — кількість розеткоутворюючих клітин, %, по осі ординат — дослідні групи.

інактивували при 85—90 °С на водяній бані протягом 30 хв. Використовували суспензії концентрацією 10^6 — $2 \cdot 10^8$ клітин/мл; 2) клітинно-зв'язаний білок А стафілокока (КЗБА), одержаний як описано раніше [4, 5]; 3) стафілококовий анатоксин (СА) виробництва НДІ епідеміології та мікробіології ім. М.Ф. Гамалєї (Москва).

Донорів (людей) імунізували тричі, з проміжком у тиждень (під лопатку підшкірно). Використовували також нелінійних морських свинок масою 350—450 г, одержаних з віварію НДІ фізіології при Київському університеті ім. Тараса Шевченка. Тварин імунізували тричі введенням (0,1 мл) у подушечку лапки інактивованої 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). У людей стан ГСТ виявляли методами *in vitro* за інтенсивністю інгібіції міграції лейкоцитів у тестах МІФ порівняно з контролем (неімунізовані СА донори). У тварин — за допомогою шкіряних реакцій на мінімально допустиму дозу антигену. Інтенсивність місцевих реакцій визначали за збільшенням площі інфільтрату в місці введення антигену порівняно з контрольними тваринами, яким вводили ізотонічний розчин. ФП людей одержували з лейкоцитів крові, морських свинок — з лейкоцитів крові, селізенки, лімфовузлів і лімфоцитів тимуса. Клітини виділяли за загальноприйнятою методикою [10]. ФП одержували за методом Lawence [15] у модифікації. Виділені клітинні суспензії руйнували десятикратним заморожуванням — розморожуванням. Одержаний екстракт діалізували, діалізат концентрували і стандартизували. Усі операції проводили за асептичних умов при 4 °С. ФП, виділений з $5 \cdot 10^8$ лейкоцитів, вважали за 1 МО ФП [15]. Одержані діалізати стерилізували фільтрацією. Далі проводили спектрофотометрію діалізатів в ультрафіолетовому світлі на вміст нуклеїнових кислот і білка за погли-

Т а б л и ц я 1. Міграція лейкоцитів донорів, імунізованих стафілококовим анатоксином (СА), в присутності різних концентрацій антигена

Показник	Контроль	Дослід		
Розведення стафілококового анатоксину		1	1:2	1:4
Маса зони міграції, мг	34,2 ± 1,6	14,3 ± 2,3	11,0 ± 3,0	27,0 ± 3,2
Інгібіція, %	—	57,6	67,8	21,0

нанням у діапазонах 260 і 280 нм відповідно. У тестах *in vitro* на антигенспецифічність додатково були використані бичачий ФП до антигенів *Rota virus* (RV) та до дифтерійно-правцевого анатоксину (АДП), одержані згідно з вищеописаною методикою.

Тестування *in vivo* проводили переносом стану ГСТ за допомогою препаратів ФП інтактним тваринам. Препарат вводили внутрішньо-шкірно в подушечку лапки тварини в дозі 0,1 мл. Стан ГСТ виявляли через добу за допомогою шкіряних проб на мінімально допустимому дозу антигену порівняно з контролем (інтактні тварини, яким не вводили ФП).

Тестування *in vitro* здійснювали за допомогою реакції інгібіції міграції лейкоцитів (ІМЛ) [9]. Використовували агарозну модифікацію методу [2, 14]. У тесті використовували лейкоцити з крові людей і лімфоцити крові, селезінки та тимуса морських свинок. Використовували також реакцію спонтанного розеткоутворення з людськими лімфоцитами за методом Seiler [20].

Результати та їх обговорення

Вивчення властивостей одержаних з лейкомаси препаратів ФП проводилося на інтактних лейкоцитах — для з'ясування інгібуючої активності ФП і на сенсibilізованих лейкоцитах — для вивчення специфічності дії препаратів. Попередньо, для визначення мінімальної дози, що неспецифічно інгібує міграцію, лімфоцити інтактних донорів культивували при різних концентраціях СА. Як контроль використовували лімфоцити інтактних донорів, що культивувалися в середовищі без антигену (табл. 1).

Стан ГСТ у донорів визначали *in vitro* за інтенсивністю інгібіції міграції клітин разом з СА порівняно з контролем. Середня маса зон міграції становила 26,0 мг вірогідно (–25,3%), в контролі — 34,8 мг. Значення дослідженого показника було достовірно менше від контрольного, що свідчило про наявність стану ГСТ у донорів ($P < 0,05$).

Здатність ФП активувати інтактні та несенсибилізовані лімфоцити оцінювали при їх культивуванні з ФП, одержаним як від інтактних донорів, так і від імунізованих (табл. 2). Встановлено, що ФП сенсibilізованих донорів інгібує міграцію інтактних і сенсibilізованих клітин, на відміну від ФП несенсибилізованих донорів.

Т а б л и ц я 2. Міграція лейкоцитів інтактних і сенсibilізованих донорів у присутності препаратів Діалізованого лейкоцитарного екстракту (ДЕЛ)

Препарат	Маса зони міграції, мг	Інгібіція, %
Лейкоцити інтактних донорів		
Контроль	34,2 ± 1,6	—
ДЕЛ донорів сенсibilізованих	№1 19,5 ± 1,4	42,9
	№2 19,3 ± 0,6	43,6
	№3 13,7 ± 1,1	59,9
	№4 12,8 ± 0,8	62,5
ДЕЛ донорів несенсibilізованих	№1 33,7 ± 1,6	1,5
	№2 31,1 ± 1,7	9,0
Лейкоцити сенсibilізованих донорів		
Контроль	29,3 ± 1,3	—
ДЕЛ донорів сенсibilізованих	№1 18,0 ± 1,2	38,6
	№2 21,5 ± 2,8	26,6
ДЕЛ донорів несенсibilізованих	№1 28,7 ± 1,8	2,0
	№2 30,6 ± 1,1	4,4

Т а б л и ц я 3. Міграція лейкоцитів інтактних і сенсibilізованих донорів у присутності Діалізованого лейкоцитарного екстракту імунізованих морських свинок

Препарат	Маса зони міграції, мг	Інгібіція, %
Лейкоцити інтактних донорів		
Контроль	30,8 ± 1,2	—
Дослід	№1 16,3 ± 0,7	47,0
	№2 19,7 ± 0,8	36,0
Лейкоцити сенсibilізованих донорів		
Контроль	40,3 ± 2,0	—
Дослід	№1 25,7 ± 3,0	36,2
	№2 17,7 ± 2,0	56,0

Т а б л и ц я 4. Міграція лейкоцитів донорів, сенсibilізованих до стафілококового анатоксину, в присутності Фактора переносу (ФП) специфічного до різних антигенів.

Препарат	Маса зони міграції, мг		Інгібіція, %
	Дослід, мг	Контроль	
Людський ФП до антигенів стафілокока	№1 14,2 ± 0,9	40,3 ± 4,2	64,8
	№2 14,2 ± 1,2	»	64,8
	№3 12,0 ± 0,7	»	70,2
	№4 18,0 ± 1,2	29,3 ± 1,3	38,6
	№5 21,5 ± 2,8	»	26,6
	№6 29,8 ± 0,8	»	1,7
Люський ФП несенсибілізованих донорів	№1 37,8 ± 1,3	40,3 ± 4,2	6,2
	№2 5,2 ± 4,2	»	12,7
	№3 28,7 ± 1,7	29,3 ± 1,3	2,0
	№4 30,6 ± 1,1	»	4,4
Стафілококовий ФП морських свинок	№1 17,7 ± 2,0	40,3 ± 4,2	36,2
	№2 25,7 ± 3,0	»	56,0
	№3 22,7 ± 1,0	29,3 ± 1,3	22,2
	№4 12,3 ± 0,6	»	58,0
Бичачий ФП до <i>Rota virus</i>	№1 34,7 ± 2,2	40,3 ± 4,2	13,9
	№2 45,5 ± 4,3	»	12,7
Бичачий ФП до анатоксину дифтерійно правцевого			1
	№1 35,5 ± 3,2	40,3 ± 4,2	1,9

Для вивчення міжвидової активності препаратів ФП досліджували міграцію інтактних і сенсibilізованих людських лейкоцитів разом з ФП, одержаним від інтактних чи імунізованих антигенами стафілокока морських свинок. Контролем була міграція інтактних і сенсibilізованих людських лейкоцитів разом з ФП інтактних чи сенсibilізованих донорів (табл. 3). Дослідження показали, що ФП імунізованих морських свинок інгібує міграцію інтактних і сенсibilізованих лейкоцитів людей, отже, володіє міжвидовою дією.

Для з'ясування антигенної специфічності препаратів ФП до антигенних субстанцій стафілокока клітини донорів, сенсibilізованих СА, інкубували разом з ФП биків, сенсibilізованих *Rota virus* чи АДП. Як контроль використовували ФП, одержаний від сенсibilізованих та несенсибілізованих до антигенів стафілокока людей і морських свинок (табл. 4). З наведених результатів видно, що людський ФП, одержан-

ний від сенсibilізованих донорів, інгібує міграцію сенсibilізованих лейкоцитів, та в деяких випадках інгібіція міграції не є стабільною. Так, ФП людський стафілококовий інгібує міграцію сенсibilізованих лейкоцитів лише на 1,7 %. ФП морських свинок до антигенних субстанцій стафілокока також інгібує міграцію. Проведені дослідження свідчать про специфічність одержаних антистафілококових препаратів ФП. Тільки в одній з серій дослідів препарат ФП сенсibilізованих донорів не впливав на міграцію сенсibilізованих гомологічних лейкоцитів. Очевидно, це може бути пов'язано з дією супресивних компонентів ФП, що спостерігалось і в інших дослідженнях [15].

Інгібіція міграції сенсibilізованих лейкоцитів донорів під дією ФП до *Rota virus* та АДП не є статистично вірогідною, що також свідчить на користь специфічності стафілококових препаратів ФП.

Спонтанне розеткоутворення лімфоцитів крові людей, оброблених гомологічним ФП до СА, показало, що кількість розеткоутворюючих клітин збільшилась на 10 — 20 % порівняно з контролем (рисунок).

Висновки

1. З лейкомаси тварин та імунізованих донорів, що знаходилися в стані гіперчутливості сповільненого типу до антигенів стафілокока, одержано антигенспецифічні препарати Фактора переносу.
2. Одержаним препаратом властива міжвидова активність.
3. Показана стимуляція спонтанного розеткоутворення під дією Фактора переносу.

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

HUMAN SPECIFIC FACTOR OF TRANSFER TO ANTIGENES OF *Staphylococcus aureus*.

Immunobiological properties of human specific transfer factor (TF) to *Staphylococcus aureus* antigenes were studied. It is shown that this TF activated human eucocytes in vitro as well as in vivo. Antigene specificity of TF's immunomodulating effects is also shown. In vitro we used eucocyte migration inhibition test (IML), macrophage inhibition test (MPI) and rosette formation (E-roz). For testing in vivo we used delayed type hypersensitivity (DTH) skin tests.

Taras Shevchenko University, Kyiv

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Джирш Д. Иммунологическая инженерия. — М.: Мир, 1982. — 288 с.
2. Суслов 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., Перепечкина Н.П., Мац А.Н., Медуницын Н.В. Адьювантные свойства трансфер-фактора из лимфоцитов миндалин человека // Журн. микробиологии. — 1979. — №2. — С.103.
4. Холодная Л.С. Белок А золотистого стафилококка. — В кн.: Иммунологическая реактивность в патологии. — Киев — Винница, 1979. — 304 с.

5. Холодная Л.С., Хоробрых В.В., Голованова Т.А. и др. Влияние антигенов стафилококка на первичный иммунный ответ // Иммунология. — 1981. — №6. — С. 34 — 37.
6. Borvak J., Mayer V., Kotuliak J. Использование полуочищенного ультрафильтрата лейкоцитов при Herpes zoster. Крупномасштабное получение и биохимический анализ // Acta Virol. — 1989. — 33. — С. 417.
7. Borvak J., Mayer V., Moravsek L. Аминокислотный анализ отдельных пиков грубого и частично очищенного ультрафильтрата лейкоцитов человека, полученный при высокоэффективной жидкостной хроматографии на обращенной фазе // Ibid. — 1990. — 34. — С.19.
8. Burger D.R., Vandenbark 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: Acad. Press, 1983. — P. 33 — 42.
9. David J.R. Delayed hypersensitivity in vitro. Effect of sensitive cells on normal cells in the presence of antigen // J. Immunol. — 1964. — 93. — №2. — P.264 — 278.
10. Ford W.L., Hunt S.V. The preparation and labelling of lymphocytes. In: Handbook of Experimental Immunology. — Vol. 2 / Ed. Weir D.M. — Oxford — London — Edinburgh — Melbourne: Blackwell Sci. Publ., 1973. — P.23.
11. Fudenberg H.H., Williams A.M., Wilson G.B., Paddock G.V. Human Transfer Factor: exogenic labelling, purification and role of ribonucleic acid segment. In: Immunobiology of Transfer Factor — New-York: Acad. Press, 1983. — P.289 — 293.
12. Fudenberg H.H., Wilson G.B., Metcalf J.F. et al. Clinical application of the leukocyte migration inhibition assay — new methods for determining transfer factor potency and predicting clinical response. In: Immunobiology of Transfer Factor — New-York: Acad. Press, 1983. — P.293—310.
13. Gottlieb A.A., Farmer J.Z., Matzura C.T. et al. Modulation of human T-cell production of migration inhibitory lymphokines by cytokines derived from human leukocyte dialysates. // J. Immunol. — 1984. — 132. — №1. — P.256.
14. Hoffman P.M., Sputler Z.E., Hsu M., Fudenberg H.H. Leucocyte migration- inhibition in agarose // Cell Immunol. — 1975. — 18. — P.21 — 30.
15. Immunobiology of Transfer Factor / Eds. Kirkpatrick C.H., Lawrence H.S., Burger D.R.- New-York: Acad. Press, 1983. — 528 P.
16. 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.
17. Lawrence H.S., Borkowsky W. A new basis for the immunoregulatory activities of Transfer Factor — an arcane dialect in the language of cells // Clin. Exp. Immunol. — 1977. — 27. — P.416.
18. Mayer V. Fifth International Workshop on Transfer Factor // Acta Virol. — 1987. — 27. — P.416.
19. Nekam K., Kalmar I., Gergely P. et al. In vitro effect of Transfer Factor on active rosettes and leukocyte migration on patients with cancer // Clin. Exp. Immunol.- 1977. — 27. — P.416.
20. Seiler F.R., Sedlacek H.H., Kanzy E.J., Lang W. Über die Brauchbarkeit immunologischer Nachweis methoden Differenzierung funktionell verschiedener lymphozyten: spontan rosetten, Komplementrezeptor Rosetten und Immunglobulin receptoren // Behring Inst. Res. Comm. — 1972. — 52. — P.26.
21. Shmidt-mayerova H., Chermann J.C., Rey F. et al. Ингибирование ВИЧ ультрафильтратом лизированных лейкоцитов // Acta Virol. — 1990. — 34. — С.262.
22. Tsang K. G., Fudenberg H.H., Pan J. F. Transfer of osteosarcoma - specific cell- mediated immunity in hamsters by rabbit dialysable leukocytes extracts. // Cell. Immunol. — 1983. — 90. — P.201.
23. Vershigora A.E., Lyubchenko T.A., Goleva E.G. et al. Human specific transfer factor of cell-mediated immunity to Staphylococcus antigen substances. — In: X-th International Symposium on Transfer Factor. Abstract Book (22-24th June 1995, Bologna, ITALY). — P.14.
24. 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.
25. Wilson G.B., Poindexter C., Trot I.D., Ludden K.D. Инициация de novo специфического опосредованного клеткой иммунного ответа у цыплят с помощью Фактора переноса, выделенного из коровьего молока и молозива // Acta Virol. — 1988. — 32. — С.6.
26. X-th International Symposium on Transfer Factor. Abstract Book (22-24th June 1995, Bologna, ITALY). — 64 P.