

УДК 547.964:612.017.1

БИОХИМИЯ

А. В. СОКОЛОВ, В. А. ФЕЛЬДБАУМ, Б. А. КЛЯЩИЦКИЙ, В. Х. МИТИНА

**ИЗУЧЕНИЕ ИММУНОДЕПРЕССИВНОЙ АКТИВНОСТИ
6-ТИОГУАНИНА, КОВАЛЕНТНО СВЯЗАННОГО
С БЕЛКОВЫМ НОСИТЕЛЕМ**

(Представлено академиком А. А. Баевым 28 III 1974)

Проблема избирательного воздействия на различные фазы формирования иммунологической реакции организма — одна из актуальных задач современной иммунологии. Например, при изучении роли макрофагов в иммунном ответе удобным инструментом могут быть конъюгаты белков с цитотоксическими веществами, способные селективно воздействовать на макрофаги в смешанной культуре макрофагов и лимфоцитов (¹).

С целью избирательного концентрирования противоопухолевых и иммунодепрессивных препаратов в лимфатической системе было предложено (²) использовать адсорбцию препаратов на различных корпускулярных носителях (активированный уголь, тушь и т. п.), исходя из известных данных о распределении в организме такого рода корпускул. Недавно нами разработан метод получения корпускулярных препаратов заданной степени дисперсности на основе различных белков, содержащих ковалентно связанные аналоги пуриновых и пиримидиновых оснований. Эти препараты, сохраняя способность фагоцитироваться макрофагами, имеют преимущество по сравнению с препаратами, основанными на сорбции или электростатическом взаимодействии, поскольку исключается десорбция биологически активного компонента с носителя, а сам носитель, в отличие от угля, туши и т. д., перерабатывается в организме в обычные продукты обмена.

В настоящей работе проведено сравнительное исследование иммунодепрессивного действия 6-тиогуанина (ТГ) в зависимости от способов его введения в организм — в свободном виде или ковалентно связанным с белковым носителем. В связи с этим показано также эффективное поглощение изученных корпускулярных препаратов макрофагами.

В работе использовали ТГ фирмы «Хемапол» (Чехословакия), бычий сывороточный альбумин (БСА) фирмы «Биомед» (Польша), ³Н-уридин (уд. акт. 1.3 С/ммоль, Ленинградский завод изотопов). Синтез 6-тиогуанозина осуществлен по методике (³). Конъюгаты БСА-ТГ впервые получены присоединением периодатокисленного тиогуанозина к БСА по методу, предложенному для природных рибонуклеозидов и рибонуклеотидов (⁴). Корпускулярные препараты, содержащие 6-тиогуанин (корпБСА-ТГ), со средним размером частиц 0,6—0,9 мкм получали поперечным сшиванием БСА-ТГ при помощи глутарового альдегида с последующим фракционированием частиц посредством гель-хроматографии и ультрафильтрации. Содержание ТГ в корпБСА-ТГ составляло 14,5 моля на 1 моль БСА. Для получения меченого корпускулярного препарата присоединение периодатокисленного тиогуанозина к БСА проводили в присутствии периодатокисленного ³Н-уридина. Следует отметить, что введение ³Н-метки в корпБСА-ТГ может быть удобно осуществлено также при применении в качестве восстановителя для стабилизации связи ТГ — белок NaB³H. Контрольные корпускулы, состоящие лишь из БСА (корпБСА), получали поперечным связыванием БСА при действии глу-

тарового альдегида; последующее фракционирование частиц проводили так же, как описано для корпБСА-ТГ (размер частиц корпБСА 0,6–0,9 мкм).

Исследование первичного иммунного ответа на введение эритроцитов барана проводили на мышах линии СВА весом 18–22 г. Иммунизацию проводили внутрибрюшинным введением эритроцитов барана ($5 \cdot 10^8$ клеток). Исследуемые препараты вводили внутривенно за 3,5 часа до иммунизации, одновременно с введением антигена, а также на 1, 2 и 3 день после иммунизации в дозе 4 мг ТГ на 1 кг веса. Количество антителообразующих клеток (а.к.) в расчете на селезенку определяли по методу Ерие — Нордина (5) на 4 день после иммунизации. Статистическую обработку результатов проводили по методу Стьюдента (табл. 1).

Перитонеальные макрофаги были выделены из перитонеального экссудата мышей линии СВА после введения им внутрибрюшинно 3 мл смеси, содержащей 4% пептона и 0,2% гликогена. Селезеночные макрофаги и лимфоциты разделяли путем засева суспензии селезеночных клеток на флаконы, используя гидролизат лактальбумина или среду 199 с добавлением 10% инактивированной бычьей сыворотки. Через 2 часа несевшие клетки отделяли (фракция лимфоцитов), а клетки,севшие на стекло, снимались механически и стмывались (фракция макрофагов). Для определения способности клеток поглощать корпускулярные препараты (рис. 1) к суспензии $8 \cdot 10^6$ соответствун-

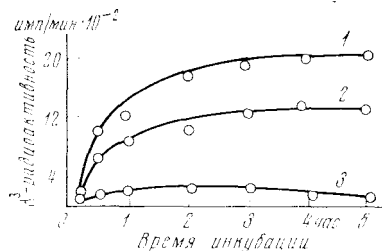


Рис. 1. Включение радиоактивной метки в клетки после инкубации с меченым корпБСА-ТГ. 1 — перитонеальные макрофаги, 2 — селезеночные макрофаги, 3 — селезеночные лимфоциты

Таблица 1

Число антителообразующих клеток на селезенку у мышей линии СВА при индукции иммунного ответа эритроцитами барана *

Препарат	Число животных	Введение за 3,5 часа до антигена	Введение одновременно с антигеном	Введение через 24 часа после антигена	Введение через 48–72 часа после антигена
Без препарата ТГ	10	104200 ± 13932	120330 ± 29996	125500 ± 10825	101244 ± 8792
	10	114260 ± 15522 <i>P</i> > 0,05	75728 ± 6104 <i>P</i> > 0,05	250892 ± 36750	45996 ± 7220
БСА-ТГ	10	5040 ± 1176	7669 ± 2123	230674 ± 14346	80797 ± 5226 <i>P</i> > 0,05
КорпБСА-ТГ	10	18088 ± 3680	19189 ± 5197	234871 ± 14068	99294 ± 5292 <i>P</i> > 0,05
КорпБСА	10	110499 ± 14834 <i>P</i> > 0,05	169458 ± 28530	218024 ± 11896	89693 ± 11894 <i>P</i> > 0,05

* Там, где *P* не указано, показатель достоверности *P* < 0,05.

щих клеток в 2 мл среды добавляли по 0,1 мл меченых корпБСА-ТГ (концентрация по белку 2 мг/мл, 22 800 имп/мин) и через указанные интервалы времени отмывали клетки от корпускул, затем обрабатывали их 2М раствором гидрата окиси аммония при 60° в течение 1 часа и определяли радиоактивность на сцинтилляционном счетчике «Mark-2» («Nuclear Chicago») в диоксановом сцинтилляторе.

Результаты исследования, приведенные в табл. 1, показывают, что ТГ, БСА-ТГ и корпБСА-ТГ по-разному влияли на формирование иммунного ответа. Так, наиболее эффективное подавление иммунного ответа не связанного с белком препарата имело место при введении ТГ через 48—

72 часа после иммунизации; при этом число а.к. уменьшалось от $10\ 1244 \pm 8792$ до $45\ 996 \pm 7220$. В остальных случаях ТГ не вызывал статистически достоверного изменения числа а.к. В противоположность этому БСА-ТГ и корпБСА-ТГ вызывали подавление иммунного ответа лишь при введении за 3,5 часа до иммунизации или одновременно с эритроцитами барана. Например, БСА-ТГ снижал число а.к. со $104\ 202 \pm 13\ 932$ до 5040 ± 1176 при введении за 3,5 часа до иммунизации и с $120\ 330 \pm 29\ 996$ до 7669 ± 2123 при введении одновременно с антигеном. При введении БСА-ТГ, корпБСА-ТГ, а также контрольных корпБСА через 24 часа после иммунизации была обнаружена стимуляция иммунного ответа. КорпБСА в остальных случаях не влиял на количество а.к.

Таким образом, существует зависимость между временем введения исследованных препаратов и эффективностью их иммунодепрессивного действия. Различия зависимости «срок введения — иммунодепрессивный эффект» для ТГ, с одной стороны, и БСА-ТГ и корпБСА-ТГ, с другой стороны, могут свидетельствовать о различных механизмах воздействия этих препаратов на изучаемую функцию. Можно предполагать, что ТГ, ковалентно связанный с белковым носителем, действует на более ранние этапы формирования иммунного ответа, чем «низкомолекулярный» ТГ. В этом смысле макрофаги могут явиться объектом начальной фармакологической реакции при действии БСА-ТГ и корпБСА-ТГ. Это подтверждается, в частности, изучением поглощения меченого корпБСА-ТГ макрофагами и лимфоцитами (рис. 1). Из рисунка видно, что перитонеальные и селезеночные макрофаги способны эффективно захватывать корпускулярный препарат. Известно, что многозамещенные белки в организме распределяются аналогично корпускулярным антигенам и коллоидам⁽⁶⁾; это, вероятно, объясняет сходство иммунодепрессивного действия БСА-ТГ и корпБСА-ТГ. Согласно предварительным данным, накопление в макрофагах корпБСА-ТГ сопровождается подавлением синтеза РНК и белка, выявленным с помощью меченых предшественников.

Макрофаги могут играть существенную роль в иммунном ответе на введение бараньих эритроцитов⁽⁷⁾. Однако роль макрофагов в формировании иммунного ответа на другие антигены до конца не выяснена⁽⁸⁾. В связи с этим корпускулярные препараты и конъюгаты иммунодепрессивных средств с макромолекулярными носителями могут найти применение при изучении механизмов иммунных реакций.

Институт экспериментальной и клинической онкологии
Академии медицинских наук СССР
Москва

Поступило
2 III 1974

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ A. Barbanti-Brodano, L. Frime, Nature, New Biology, v. 243, 281 (1973). ² Г. Я. Свет-Молдавский, А. И. Павлоцкий, ДАН, т. 178, 252 (1968). ³ J. J. Fox, J. Wempen et al., J. Am. Chem. Soc., v. 80, 1669 (1958). ⁴ B. F. Erlanger, S. M. Beiser, Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A., v. 52, 68 (1964). ⁵ N. Jerne, A. Nordin, Science, v. 140, 405 (1963). ⁶ Ф. Гауровиц, Иммунохимия и биосинтез антител, М., 1969. ⁷ K. Shortman, J. Palmer, Cell. Immunol., v. 2, 399 (1971). ⁸ Ф. Бернет, Клеточная иммунология, М., 1971.