

Л.Н. Федянина¹, Н.Н. Беседнова², Л.М. Эпштейн³, Т.К. Каленик¹

ИММУНОТРОПНОЕ ДЕЙСТВИЕ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНОГО ВЕЩЕСТВА – ДНК ИЗ МОЛОК ЛОСОСЕВЫХ РЫБ В ЭКСПЕРИМЕНТЕ

¹ Институт пищевых технологий и товароведения Тихоокеанского государственного экономического университета (Владивосток)

² Научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии СО РАМН (Владивосток)

³ Тихоокеанский научно-исследовательский рыбохозяйственный центр (Владивосток)

Изучены в эксперименте на различных моделях иммуномодулирующие свойства биологически активного вещества (БАВ) ДНК из молок лососевых рыб. Показано, что ДНК из молок лососевых рыб обладает сложным многогранным дозозависимым действием на иммунную систему организма, (наиболее активная доза – 10 мг/кг веса мыши). БАВ ДНК умеренно стимулирует клеточный и гуморальный иммунитет. ДНК модулирует продукцию цитокинов in vitro: исходно низкая продукция цитокинов усиливается, исходно высокая ослабляется. Введение ДНК из молок лососевых рыб обуславливает повышение уровня цитокинов, вырабатываемых преимущественно Th1-клетками (ИФН-γ), т.е. может способствовать развитию клеточного иммунного ответа. Действие ДНК на T-систему иммунитета обеспечивает в эксперименте защиту макроорганизма от факультативных внутриклеточных патогенов (листерий), индуцирует усиление продукции IFNγ.

Ключевые слова: ДНК рыб, иммуномодулирующие свойства

THE IMMUNOTROPIC EFFECT OF BIOLOGICALLY ACTIVE ADDITIVE – SALMON SOFT ROE DNA IN EXPERIMENT

L.N. Fedyanina¹, N.N. Besednova², L.M. Epshtein³, T.K. Kalenik¹

¹ Far Eastern Academy of Economics and Management, Vladivostok

² Research Institute of Epidemiology and Microbiology of SB RAMS, Vladivostok

³ Pacific Research Institute of Fish Industry, Vladivostok

It was investigated immunotropic properties of biologically active additive (BAA) – salmon soft roe DNA on different models in experiment. It was shown that salmon soft roe DNA has multifunctional dosage effect on immune system of organism (the most active dose – 10mg/kg of mouse weight). BAA DNA stimulates humoral and cellular immunity. DNA has selected regulative effect to cytokines by recovering of their balance. Introduction of salmon soft roe DNA increases cytokines level which are produced by Th-1 cells, thus can help cellular immunoresponce. In experiment DNA influence on T-immune system protects organism from intracellular bacteria (Listeria Monocytogenes), activates IFNγ production.

Key words: fish DNA, immunotropic effect

Нуклеиновые кислоты в настоящее время широко используются в медицине в качестве иммуномодуляторов. Входящие в состав ДНК азотистые соединения (аденин и гуанин) являются структурной основой для низкомолекулярных биологически активных коферментов и кофакторов, лимитирующих биологические процессы во всех органах и тканях организма.

К настоящему времени получены данные об иммуномодулирующей активности ДНК, которые внесли существенные изменения в классическое представление о нуклеиновых кислотах как об иммунологически инертных молекулах [5].

Было установлено, что иммуностимулирующие свойства бактериальной ДНК обусловлены последовательностями нуклеотидов, содержащих центральные метилированные CpG-динуклеотиды в составе определенной последовательности молекул [5].

Считали, что в ДНК позвоночных отсутствуют аналогичные CpG мотивы, в связи с чем, ДНК позвоночных не оказывает на организм иммуномо-

дулирующее действие. Однако позднее было показано, что ДНК позвоночных все же содержит небольшое количество потенциально иммуностимуляторных CpG мотивов, и, по-видимому, различия в их действии связаны преимущественно с присутствием в геноме позвоночных иммунотриализующих последовательностей [6].

Установлено, что ДНК, полученная из молок разных рыб, также обладает иммуномодулирующими свойствами. На основе этой нуклеиновой кислоты созданы фармакологические препараты – деринат (ДНК из молок осетровых рыб), полидан (смесь ДНК и РНК из молок осетровых рыб), плацентекс-интегро (ДНК из молок форели), и биологически активные добавки (БАД) к пище – «Биостим» (ДНК из молок осетровых рыб), «ДНКас», «ДНКавИТ» (ДНК из молок лососевых рыб) [1–3, 8, 9].

Исследованиями Н.Н. Беседновой с соавторами было показано, что биологически активное вещество (БАВ) ДНК, лежащее в основе БАД – ДНКас, ДНКавИТ, обладает иммуномодулирующими свойствами [1, 2, 4].

Целью настоящей работы является продолжение исследований по изучению иммуотропного действия БАВ ДНК из молок лососевых рыб и механизмов его обеспечивающих.

МЕТОДИКА

Изучаемое БАВ – низкомолекулярная ДНК разработана в ТИНРО-центре, выпускается в настоящее время, в виде БАД к пище с витамином С (ДНКaС) и витаминами группы В (ДНКaВИТ). Сырьем для получения ДНК являются мороженые молоки лососевых рыб. ДНК выделяют методом солевой экстракции, затем осаждают конечное вещество из раствора этиловым спиртом, удаляют жир и влагу сушкой на воздухе при комнатной температуре. В ее состав входит 79,02 % ДНК, 7,8 % белка, 2,1 % липидов и 10,68 % воды. Молекулярная масса препарата составляет 270 – 500 кДа. Препарат представляет собой аморфный порошок светло-кремового цвета, растворимый в воде при нагревании и не растворимый в органических растворителях.

Иммуномодулирующее действие ДНК изучали в экспериментах на 320 неинбредных мышах, мышах-гибридах F1 (СВА × С57DL/6), массой 14 – 18 г, полученных из питомника РАМН «Столбовая», выполняя все правила, предусмотренные приказом Министерства Здравоохранения № 755 от 12.08.1977.

Клеточное звено иммунитета оценивали *in vivo*: по реакции гиперчувствительности замедленного типа (ГЗТ) в соответствии с методом Р.Н. Lagrange et al. [10] и на модели экспериментального листериоза; *in vitro* – по реакции бласттрансформации лимфоцитов, (РБТЛ) которую проводили общепринятым методом. Для создания модели Т-клеточного иммунодефицита – экспериментального листериоза был использован штамм *Listeria monocytogenes* № 59, полученный из музея лаборатории экологии патогенных бактерий НИИ ЭМ СО РАМН.

При изучении влияния ДНК на В-систему иммунитета определяли общепринятым методом титры антител (АТ) к эритроцитам барана (ЭБ) в сыворотке крови, число антителообразующих клеток (АОК) в селезенках мышей иммунизированных ЭБ – метод N.K. Yerne, F.N. Nordin [11].

Изучение продукции цитокинов проводилось при культивировании цельной крови, в супернатантах крови доноров по методу твердофазного

иммуоферментного анализа с помощью наборов Duoset (Cambridge, USA).

Полученные результаты обрабатывали статистически с применением компьютерной программы «Статистика 5».

РЕЗУЛЬТАТЫ

При изучении влияния ДНК на реакцию ГЗТ было установлено, что, БАВ в дозе 10 мг/кг веса мыши, оказывала более выраженное действие на индуктивную фазу реакции, чем на продуктивную. При введении за 3-е суток до сенсбилизации мышей, прирост массы лапки в % составил – 29,4 ± 3,0 по сравнению с данными контрольной группы – 16,4 ± 0,6, *p* < 0,001, и за сутки 31,7 ± 3,9 % и 18,9 ± 0,9 соответственно, *p* < 0,01. Показатели прироста массы лапки в продуктивную фазу ГЗТ составили в опыте 26,5 ± 2,9 %, *p* < 0,05, в контроле 19,4 ± 1,1 % (одновременное введение с сенсбилизующей дозой) и 27,4 ± 3,2 и 18,1 ± 0,8, *p* < 0,05 соответственно (перед введением разрешающей дозы). Усиление реакции ГЗТ, наблюдаемое в 1-ю фазу клеточного иммунного ответа вероятно обусловлено влиянием БАВ на процессы активации CD4⁺-Т-клеток и дифференцировки их в Тх1.

При изучении влияния ДНК на реакцию бласттрансформации лимфоцитов было установлено, что ДНК дозозависимо, в основном – 10 и 100 мг/мл, умеренно стимулирует как спонтанную, так и митогениндуцированную РБТЛ. Вероятно, усиление пролиферации спленоцитов, вызванное внесением БАВ в культуру клеток, сопровождается и повышением пролиферативного ответа клеток на Т-клеточный митоген.

Исследование влияния ДНК на гуморальное звено иммунитета продемонстрировало способность этого препарата вызывать поликлональную активацию В-системы иммунитета. При введении 1, 10 и 100 мг/кг ДНК в индуктивную фазу антителиобразования наблюдалось достоверное повышение количества АОК в селезенке в 1,8, 2,6 и 2,5 раза соответственно по сравнению с контролем. Действие ДНК на продуктивную фазу антителиобразования было менее выраженным: при дозе 1 мг/кг ИС (индекс стимуляции) составил 1,7, при 10 мг/кг и 100 мг/кг – 1,9.

При исследовании влияния ДНК на динамику сывороточных антител у мышей на 4, 7 и 14 сутки после иммунизации достоверное повышение показателя во все сроки наблюдения отмечалось только

Таблица 1
Влияние различных доз ДНК на спонтанную и митогениндуцированную пролиферацию лимфоцитов

| № п/п | Группа | Включение ³ H-тимидина, имп/мин | | | |
|-------|-----------------|--|-----|---|------|
| | | Спонтанная пролиферация лимфоцитов | ИС | Митогениндуцированная пролиферация лимфоцитов | ИС |
| 1 | Контроль | 878 ± 95 | – | 9 995 ± 721 | – |
| 2 | ДНК – 1 мг/мл | 1 230 ± 125* | 1,4 | 12 350 ± 750* | 1,2 |
| 3 | ДНК – 10 мг/мл | 1 548 ± 98*** | 1,8 | 15 525 ± 1 230*** | 1,55 |
| 4 | ДНК – 100 мг/мл | 1 590 ± 102*** | 1,8 | 18 230 ± 1 150*** | 1,8 |

при дозе 10 мг/кг — $7,8 \pm 0,28$, $p < 0,05$ (в контроле $6,7 \pm 0,26$), $7,9 \pm 0,34$, $p < 0,05$ ($7,0 \pm 0,27$), $8,0 \pm 0,27$, $p < 0,01$ ($6,8 \pm 0,19$). При введении ДНК в других дозах ее действие было менее выраженным.

При изучении протективного действия ДНК при экспериментальной листериозной инфекции определяли выживаемость и среднюю продолжительность жизни мышей (СПЖ), зараженных *Listeria monocytogenes* 1LD₁₀₀ (без применения этиотропного лечения) в зависимости от дозы введения препарата, времени введения БАВ, схемы его введения.

Как показали полученные результаты, выживаемость животных, получавших ДНК в дозе 10 мг/кг, по лечебной схеме, была в три раза выше ($31,6 \pm 3,4$ %), а СПЖ в два раза больше ($14,7 \pm 0,8$ дня), по сравнению с группой животных, не получивших ДНК ($11,1 \pm 4,0$ % и СПЖ — $8,3 \pm 1,05$ дней соответственно).

Наибольший процент выживших животных отмечался при введении ДНК через 1 час ($41,9 \pm 9,0$ %, СПЖ = $15,35 \pm 2,4$ дней, $p < 0,001$) и 2 суток ($46,2 \pm 8,1$ %, СПЖ = $17,2 \pm 2,0$ дней, $p < 0,001$) после заражения, по сравнению с контролем.

По данным И.С. Тартаковского и др. [6] развитие инфекции, обусловленной листериями, характеризуется значительным угнетением клеточного звена иммунного ответа. Одним из основных механизмов иммунного ответа на листерии является активация системы цитокинов. Показано, что в формирующемся очаге воспаления уже через 30 минут после заражения отмечается продукция цитокинов ИЛ-1, -6, -10, -12, ФНО- α , ИФН- γ и др., а полностью реализация иммунного ответа проходит в две фазы на протяжении 2 — 4 дней [7].

Как, вполне очевидно, защитное действие ДНК наиболее эффективно именно на этом этапе развития инфекции, этапе формирования иммунного ответа. Вероятно, ДНК, введенная через час после заражения листериями, нормализует дисбаланс цитокинов и переключает иммунный ответ по Th 1 типу, что является решающим фактором в выживаемости и СПЖ мышей.

Поэтому на следующем этапе работы мы изучали влияние ДНК *in vivo* на способность клеток крови здоровых доноров продуцировать цитокины: ИЛ-10, TNF- α , ИФН- γ . Выбор их был не случаен. Оппозиционные пулы цитокинов — ИФН- γ и ИЛ-10 рассматриваются как маркеры Th 1 и Th 2

типа лимфоцитов, первый из которых усиливает клеточно-опосредованный иммунный ответ, второй — гуморальный [8, 9]. TNF- α обладает ярко выраженной плейотропностью, вовлечен как в эффекторное, так и в регуляторное звено организма человека. Появление этого цитокина регистрируется на самых ранних этапах патологического процесса, он считается основным провоспалительным цитокином, ИЛ-10 относят к противовоспалительным цитокином [8, 9].

Доза ДНК, подобранная экспериментально, составляла 50 мкг/мл.

Интенсивность продукции цитокинов, вырабатываемых в контрольных культурах, отличалась заметной гетерогенностью у различных доноров и составила: ИЛ-10 — от 0,1 пг/мл до 199,96 пг/мл; TNF- α — от 3,1 пг/мл до 2223,44 пг/мл; ИФН- γ — от 3,42 пг/мл до 115,41 пг/мл.

Для интерпретации результатов, все показатели условно делили на 3 группы (ориентируясь на исходный уровень спонтанной секреции цитокинов): в 1-ю группу были включены доноры с исходно низкими показателями, во 2-ю группу — со средними, в 3-ю входили доноры с исходно высокими показателями. БАВ ДНК оказывало модулирующее действие на способность всех клеток к продукции цитокинов: при исходно низких показателях, обеспечивало повышение их продукции; в группах с высокой концентрацией цитокинов, подавляло их; при средних значениях практически не меняло их уровня.

Сравнительный анализ изменения концентрации провоспалительного цитокина TNF- α и противовоспалительного ИЛ-10 на фоне введения ДНК показал, что более выраженное действие БАВ оказывает на клетки продуценты первого. Степень стимуляции синтеза TNF- α также была выше аналогичного показателя ИЛ-10.

Представляется возможным, что подобный эффект ДНК лежит в основе его способности усиливать антиинфекционную резистентность макроорганизма, т.к. именно провоспалительные цитокины являются одними из главных активаторов функциональной активности фагоцитарных клеток [8, 9].

Действие БАВ на цитокининдуцирующую активность Th1 (ИФН- γ) и Th2-клеток (ИЛ-10) несколько различалось. Наибольшее влияние — по степени проявления стимулирующего действия — ДНК про-

Таблица 2
Влияние ДНК на продукцию цитокинов клетками крови здоровых доноров, пг/мл

| Цитокины | Группа с исходно низкими показателями | | Группа с исходно средними показателями | | Группа с исходно высокими показателями | |
|---------------|---------------------------------------|----------------------|--|------------------|--|---------------------|
| | Контроль | ДНК | Контроль | ДНК | Контроль | ДНК |
| TNF α | $37,9 \pm 8,9$ | $95,9 \pm 17,6^{**}$ | $200,8 \pm 35,5$ | $283,9 \pm 56,7$ | $1045,2 \pm 265,6$ | $504,6 \pm 110,5^*$ |
| IFN- γ | $8,8 \pm 1,1$ | $29,4 \pm 6,4^{**}$ | $18,5 \pm 1,1$ | $19,3 \pm 3,3$ | $69,4 \pm 16,7$ | $40,2 \pm 11,3^*$ |
| IL-10 | $4,7 \pm 0,7$ | $8,7 \pm 1,3^*$ | $24,2 \pm 4,6$ | $27,8 \pm 13,4$ | $146,2 \pm 13,2$ | $58,8 \pm 15,7^*$ |

Примечание: * — $p < 0,05$; ** — $p < 0,01$; *** — $p < 0,001$.

являла в отношении ИФН- γ (ИС = $2,6 \pm 0,7$), нежели ИЛ-10 (ИС = $2,0 \pm 0,2$), что дает основание предполагать, что ДНК в большей степени модулирует иммунный ответ по Т-клеточному типу.

ВЫВОДЫ

1. ДНК из молок лососевых рыб обладает сложным многогранным дозозависимым действием на иммунную систему организма (наиболее активная доза — 10 мг/кг веса мыши).

2. БАВ ДНК умеренно стимулирует клеточный и гуморальный иммунитет.

3. ДНК модулирует продукцию цитокинов *in vitro*: исходно низкая продукция цитокинов усиливается, исходно высокая ослабляется. Введение ДНК из молок лососевых рыб обуславливает повышение уровня цитокинов, вырабатываемых преимущественно Тх1-клетками (ИФН- γ), т.е. может способствовать развитию клеточного иммунного ответа.

4. Действие ДНК на Т-систему иммунитета обеспечивает в эксперименте защиту макроорганизма от факультативных внутриклеточных патогенов (листерий), индуцирует усиление продукции ИФН- γ .

ЛИТЕРАТУРА

1. Беседнова Н.Н. Дезоксирибонуклеиновая кислота (ДНК) из молок рыб — перспективы клинического применения (в помощь практическому врачу) / Н.Н. Беседнова, Л.М. Эпштейн. — Владивосток: ТИНРО-центр, 2002. — 38 с.

2. Иммунотропные свойства дезоксирибонуклеиновой кислоты из молок лососевых рыб / Н.Н. Беседнова, Ю.И. Касьяненко, Л.М. Эпштейн и др. // Антибиотики и химиотерапия. — 1999. — № 10. — С. 13—15.

3. Влияние полидезоксирибонуклеотида на продукцию цитокинов и пролиферацию культур клеток человека *in vitro* / О.Н. Щегловитова, Е.В. Мирончекова, Ю.Г. Романов и др. // Иммунология. — 2005. — Т. 26, № 2. — С. 87—90.

4. Получение и свойства производных ДНК из молок лососевых / Ю.И. Касьяненко, Ю.В. Ковалева, Л.М. Эпштейн и др. // Известия ТИНРО-центра. — 1997. — № 120. — С. 37—43.

5. Рыкова Е.Ю. Активирующее влияние ДНК на иммунную систему / Е.Ю. Рыкова, П.П. Лактионов, В.В. Власов // Усп. совр. биол. — 2001. — Т. 121. — № 2. — С. 160—171.

6. Серебряная Н.Б. ДНК как иммуностимулятор / Н.Б. Серебряная, А.А. Новик // Мед. иммунол. — 2001. — Т. 3, № 1. — С. 27—34.

7. Тартаковский И.С. Листерии: роль в инфекционной патологии человека и лабораторная диагностика / И.С. Тартаковский, В.В. Малеев, С.А. Ермолаева. — М.: Медицина для всех, 2002. — 200 с.

8. Хаитов Р.М. Иммуномодуляторы и некоторые аспекты их клинического применения / Р.М. Хаитов, Б.В. Пинегин // Клиническая медицина. — 1996. — № 8. — С. 7—13.

9. Хаитов Р.М. Иммуномодуляторы: механизм действия и клиническое применение / Р.М. Хаитов, Б.В. Пинегин // Иммунология. — 2003. — Т. 24, № 4. — С. 196—203.

10. Lagranje P.H. Influence of dose and rout of antigen infection of T-cells / P.H. Lagranje, J.B. Mackaness, T.E. Miller // Exp. Med. — 1974. — Vol. 139. — P. 528—542.

11. Yerne N.K., Nordin F.N. Plaque formation in agar by single antibody producing / N.K. Yerne, F.N. Nordin // Science. — 1963. — Vol. 140. — P. 405—407.