

ВЛИЯНИЕ ДЕЗОКСИРИБОНУКЛЕИНОВОЙ КИСЛОТЫ ИЗ МОЛОК ЛОСОСЕВЫХ РЫБ НА СЕКРЕЦИЮ ЦИТОКИНОВ КЛЕТКАМИ КРОВИ ЗДОРОВЫХ ДОНОРОВ

Федянина Л.Н.

Научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии СО РАМН,
г. Владивосток, Россия

Резюме. Изучено влияние ДНК из молок лососевых рыб на секрецию клетками крови здоровых доноров *in vitro* ранних гемопоэтических факторов (IL-3, GM-CSF, TNF α) и воздействие биологически активных веществ (БАВ) на баланс маркерных цитокинов Th1 и Th2 ответа. (IFN γ , IL-10).

Установлено, что ДНК оказывает модулирующее действие на секрецию всех исследованных цитокинов –IL-3, GM-CSF, TNF α , IFN γ , IL-10 клетками крови здоровых доноров, повышая исходно низкую их концентрацию, снижая исходно высокую и не оказывая существенного влияния на средний уровень их секреции. Под действием ДНК наблюдается более значительное, по сравнению с IL-10 (индекс стимуляции (ИС)=1,9), повышение уровня IFN γ (ИС=3,3). Таким образом, показано, что ДНК из молок лососевых рыб обладает иммуномодулирующими свойствами.

Ключевые слова: туберкулез, лекарственная чувствительность, лимфоциты, субпопуляции.

Fedjanina L.N.

SALMON SOFT ROE DNA ON BLOOD CELLS SECRETION OF CYTOKINES IN HEALTHY DONORS

Abstract. Salmon soft roe DNA influence on healthy donors blood cells secretion of early hemopoietic factors (IL-3, GM-CSF, TNF α) as well as biologically active substance influence on cytokine balance of Th1 and Th2 responses (IFN γ , IL-10) *in vitro* was studied.

It is established, that DNA has modulatory effect on secretion of all investigated cytokines - IL-3, GM-CSF, TNF α , IFN γ and IL-10 by blood cells of healthy donors, increases their initially low concentration, reduces initially high and does not have essential influence at an average level of their secretion. Under action of DNA IFN γ level (stimulation index=3,3) increases more significantly than IL-10 level (stimulation index =1,9). Thus, salmon soft roe DNA possesses immunomodulatory properties. (*Med. Immunol.*, 2005, vol.7, № 5-6, pp 617-619)

Введение

В настоящее время препараты нуклеиновых кислот различного происхождения достаточно широко применяются в качестве иммуномодуляторов. К ним относятся: нуклеинат натрия – РНК, полученный из дрожжей; деринат - натриевая соль нативной ДНК, выделенная из молок осетровых рыб; полидан - смесь

натриевых солей ДНК и РНК, также получаемая из молок осетровых рыб; ридостин - РНК, выделенная из пекарских дрожжей, ряд синтетических препаратов [4, 9].

Показано, что иммуотропная активность ДНК прокариотов обусловлена, в основном, наличием неметилированных динуклеотидов CpG, в контексте специфических оснований. ДНК позвоночных содержит небольшое количество подобных потенциальных иммуностимуляторных CpG мотивов наряду с присутствием в геноме иммуонейтрализующих последовательностей, но, тем не менее,

Адрес для переписки:

Федянина Людмила Николаевна,
690087, г. Владивосток, ул. Сельская, д.1.
Тел.: (4232) 44-14-38. E-mail: fedyanina@pochta.ru

также обладает иммуномодулирующими свойствами [5, 6, 12, 13].

Однако, не изучены факторы, определяющие иммуотропные свойства ДНК позвоночных, типы отвечающих иммунокомпетентных клеток и механизмы их активации.

Установлено, что ДНК из молок лососевых рыб - биологически активное вещество (БАВ), повышает антиинфекционную резистентность мышей в отношении *Escherichia coli* и *Salmonella enteritidis*, стимулирует антителогенез, усиливая образование антителообразующих клеток в селезенках мышей, повышает поглотительную и переваривающую активность клеток системы мононуклеарных фагоцитов. Показано ее активирующее действие на факторы гуморального иммунитета, неспецифической резистентности [1, 2, 7, 8]. Однако не исследованы механизмы иммуотропного действия ДНК.

Целью нашей работы явилось изучение влияния ДНК из молок лососевых рыб на секрецию клетками крови здоровых доноров *in vitro* ранних гемопоэтических факторов (IL-3, GM-CSF, TNF α) и воздействие БАВ на баланс маркерных цитокинов Th1 и Th2 ответа (IFN γ , IL-10).

Материалы и методы

БАВ ДНК из молок лососевых рыб получена учеными ФГУП «Тихоокеанский научно-исследовательский рыбохозяйственный центр» (ТИНРО-центр) в г. Владивостоке [3].

В ее состав входит 79,02% ДНК, 7,8% белка, 2,1% липидов и 10,68% воды. Молекулярная масса препарата составляет 270-500 кДа, гиперхромный эффект – не менее 37%. ДНК представляет собой аморфный порошок светло-кремового цвета, растворимый в воде при нагревании и не растворимый в органических растворителях [1, 2, 7, 8].

Уровни цитокинов IL-3, GM-CSF, TNF α , IFN γ , IL-10 - определяли в цельной крови здоровых доно-

ров после специфической стимуляции клеток ДНК методом твердофазного иммуоферментного анализа с помощью наборов Duoset (Genzyme diagnostics, Cambridge, USA) [11]. Дозу ДНК (50 мкг/мл) подбирали экспериментально.

Готовую кровь от доноров (28 человек), разбавляли стерильной средой RPMI 1640 с 3% глутамином и 100 мкг/мл гентамицина. К 1,35 мл разбавленной крови добавляли 0,15 мл среды RPMI 1640 и 0,15 мл исследуемого вещества (конечная концентрация 50 мкг/мл). Пробирки помещали в термостат на 18-72 часа, затем кровь центрифугировали в течение 5 минут, супернатант отбирали и хранили при -20°C.

Математическую обработку полученных результатов проводили с использованием методов вариационной статистики с применением непараметрического Т-критерия Уилкоксона для попарно связанных пар [10].

Результаты и обсуждение

Интенсивность продукции цитокинов, вырабатываемых в контрольных культурах (спонтанная секреция) отличалась выраженной гетерогенностью у различных доноров. Уровень IL-3 колебался от 0,01 пг/мл до 34,03 пг/мл; GM-CSF от 0,21 пг/мл до 34,52 пг/мл; TNF- α от 3,1 пг/мл до 2223,44 пг/мл; IFN- γ от 3,42 пг/мл до 115,41 пг/мл; IL-10 от 0,1 пг/мл до 199,96 пг/мл. Для анализа результатов полученные показатели условно делили на 3 группы: в 1-ю группу были включены показатели доноров с исходно низкими уровнями цитокинов; во 2-ю группу – со средними, в 3-ю - с исходно высокими (табл.1).

В группе доноров с исходно низкими показателями секреции всех цитокинов при добавлении ДНК наблюдалась стимуляция синтеза всех цитокинов (табл.1). Индекс стимуляции изучаемых цитокинов составил: IL-3 - 4,4; TNF α - 2,5; IL-10 - 1,9; IFN γ - 3,3; GM-CSF - 5,7. В наибольшей сте-

Табл. 1. 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
IL-3	0,5 \pm 0,1	2,2 \pm 0,6*	2,9 \pm 0,3	2,1 \pm 0,6	21,0 \pm 0,8	11,1 \pm 8,9*
GM-CSF	0,4 \pm 0,1	2,3 \pm 1,0*	3,5 \pm 0,6	2,9 \pm 0,9	13,1 \pm 2,1	5,0 \pm 1,9*
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

пени возросли уровни секреции ранних гемопоэтических цитокинов GM-CSF (ИС=5,7) и IL-3 (ИС=4,4). При этом процент доноров с высокими цифрами уровня секреции GM-CSF был наименьшим среди этой группы и составил-66,7%. В большем проценте случаев на введение ДНК реагировал TNF α (86,75%), однако уровень повышения его секреции оказался наименьшим (ИС=2,5). Самый низкий уровень продукции и процент вовлечения в него доноров был у IL-10 (ИС=2,9 и 76,9%, соответственно). Показатели роста продукции IFN- γ занимали промежуточное положение. В группе со средними показателями при введении ДНК концентрация всех цитокинов в супернатантах статистически не отличалась от таковой в контроле (табл.1). Однако наблюдалась тенденция к повышению уровня IFN- γ , TNF α и IL-10 и снижению показателей GM-CSF и IL-3. В группе с исходно высокими уровнями цитокинов ДНК проявляла ингибирующее, но также не равнозначное по интенсивности действие на секрецию всех исследуемых цитокинов. В большей степени и примерно одинаково ДНК ингибировала продукцию GM-CSF и IL-10; в 85,7% случаев инициировала снижение концентрации GM-CSF в 2,6 раза, с $13,1 \pm 2,1$ пг/мл до $5,0 \pm 1,9$ пг/мл, и IL-10 в 2,5 раза, с $146,2 \pm 13,2$ пг/мл – до $58,8 \pm 15,7$ пг/мл. Уровни TNF α и IL-3 также снижались в 83,3 % и 85,7% случаев, в 2 и 1,9 раза, соответственно. Наименее чувствительным к действию ДНК в группе доноров с исходно высокими уровнями цитокинов, оказался IFN- γ , уровень которого уменьшился в 1,7 раза. Таким образом, ДНК оказывает модулирующее действие на секрецию всех исследованных цитокинов – IL-3, GM-CSF, TNF α , IFN- γ и IL-10 клетками крови здоровых доноров, повышая исходно низкую их концентрацию, снижая исходно высокую и не оказывая существенного влияния при среднем уровне их секреции.

Введение ДНК обуславливает повышение уровня цитокинов, вырабатываемых преимущественно Th1-клетками (IFN γ), т.е. способствует развитию клеточного иммунного ответа *in vitro*. Сопоставление иммуностимулирующего действия БАВ и бактериальной ДНК, позволяет определить некоторое сходство. Однако, как мы уже упоминали, иммуностимулирующее действие бактериальной ДНК обусловлено наличием в ее структуре метилированных CpG-динуклеотидов в составе определенных последовательностей [4, 5, 11, 12], которых очень немного в ДНК позвоночных, при наличии иммунонейтрализующих/иммуносупрессивных мотивов [5, 6, 12, 13]. Исходя из этого,

можно сделать предположение, что либо иммуностимулирующий эффект бактериальной ДНК обусловлен не только CpG-динуклеотидами, либо в молекуле ДНК позвоночных существуют свои собственные структуры, ответственные за ее активирующее влияние на иммунную систему. Это делает перспективным дальнейшее изучение ДНК природного происхождения, ее структуры и механизмов иммуотропного действия.

Список литературы

1. Беседнова Н.Н., Касьяненко Ю.И., Эпштейн Л.М., Гажа А.К. Иммуотропные свойства дезоксирибонуклеиновой кислоты из молок лососевых рыб // Антибиотики и химиотерапия. -1999.- т.44.- №10.-С.13-16.
2. Беседнова Н.Н., Эпштейн Л.М. Дезоксирибонуклеиновая кислота (ДНК) из молок рыб-перспективы клинического применения (в помощь практическому врачу). -2002., Владивосток: ТИПРО-центр -38с.
3. Патент СССР № 915446 .Способ получения ДНК из молок рыб / Гаймула М.А., Кална В.Х., Микстайс У.Я., Эпштейн Л.М.-Заяв.10.10.80; Оpubл. 01.07. 91.
4. Пашук Л.К., Апрышко Г.Н., Трещалина Е.М. Препараты ДНК как потенциальные терапевтические средства // Хим-фарм. журн.- 1995. -№ 6.- С.61-64.
5. Рыкова Е.Ю., Лактионов П.П., Власов В.В. Активирующее влияние ДНК на иммунную систему // Усп. совр. биол.-2001.-№121.- С.160-171.
6. Серебряная Н.Б., Новик А.А. ДНК как иммуностимулятор // Медицинская иммунология.- 2001.-т.3. - №1.-С.27-34.
7. Федянина Л.Н., Потапова В.В., Эпштейн Л.М. Влияние ДНК из молок лососевых рыб на некоторые показатели гуморального иммунного ответа // Тез. докл. XI Российской национальный конгресс «Человек и лекарство». – Москва. 2004. – С. 845.
8. Федянина Л.Н., Каленик Т.К., Потапова В.В. Иммуномодулирующее действие ДНК из молок лососевых рыб // Здоровье и образование. Материалы Международной научно-практической конференции. Пермь. – 2004.- С. 277-297.
9. Хаитов Р.М., Пинегин Б.В. Иммуномодуляторы: механизм действия и клиническое применение //Иммунология.-2003.-т.24.-№ 4.-С.196-203.
10. Лакин Г.Ф. Биометрия. М.: Высшая школа, 1990. – 352 с.
11. De Groote D., Zangerle P.F., Gevaert Y. et al. Direct stimulation of cytokines (IL-1 α , TNF- α , IL-6, IL-2, IFN- γ and GM-CSF) in whole blood. Comparison with isolated PBMC stimulation // Cytokine. – 1992. - №4.- P. 239 - 248.

поступила в редакцию 10.07.2005
принята к печати 15.09.2005