

МІНІСТЕРСТВО ОХОРОНИ ЗДОРОВ'Я УКРАЇНИ
УКРАЇНСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ МЕДИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
ІМ. АКАД. О. О. БОГОМОЛЬЦЯ

На правах рукопису

ГОРДІЄНКО АНДРІЙ ІВАНОВИЧ

ІМУНОБІОЛОГІЧНІ ВЛАСТИВОСТІ ОСНОВНИХ
ПШЛКОВИХ АЛЕРГЕНІВ АМБРОЗІЇ ПОЛІНОЛИСТОЇ

14.03.08

—14.03.14— імунологія та алергологія

А В Т О Р Е Ф Е Р А Т

дисертації на здобуття наукового ступеня
кандидата біологічних наук

Київ - 1996

612.017

ЛНБ України ім. В. Стефаника



00754301 (K)

Дисертацією в рукописі

Робота виконана в Кримському Медичному Інституті

Науковий керівник: лауреат Державної премії України,
доктор медичних наук, професор
Кривошаїн Ю. С.

Офіційні опоненти: доктор медичних наук, професор
Дранник Г. М.

доктор біологічних наук
Мінченко Ж. М.

Провідна установа: Київський Державний Інститут
Удосконалення Лікарів

Захист дисертації відбудеться 6.13.90 4.04. 1996 р. на
васіданні Спеціалізованої Вченої Ради Д.01.21.03 у Київському
Національному Медичному Університеті ім. акад. О.О. Богомольця за
адресою: 252004, Київ, Б. Т. Шевченко, 13.

З дисертацією можна ознайомитись у бібліотеці Київського
Національного Медичного Університету.

Автореферат розісланий 4.03. 1996 р.

Вчений секретар Спеціалізованої
Вченої Ради, доктор медичних наук

ЛНБ ім. В. Стефаника
В. Г. Бордонос
АН України

AB-34.176

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

Актуальність проблеми. На сьогодні в усьому світі, і в першу чергу в індустріально розвинутих країнах, спостерігається значне збільшення кількості алергічних захворювань. За прогнозами експертів Всесвітньої організації охорони здоров'я, до 2000 року алергічні захворювання за розповсюдженням вийдуть на перше місце. Хоча більшість алергозів не відноситься до вкрай важкої патології, висока частота трапляння робить їх важливою соціально-економічною проблемою [Либерман Ф. и др., 1986; Пыцкий В.И. и др., 1991].

Класичним алергічним захворюванням, яке виникає при сенсибілізації пилюком рослин, є поліноз (сінна лихоманка, сінна нежить, весняний катар, пилюкова ринопатія, пилюкова астма). Поліноз - досить розповсюджене захворювання; в середньому на нього страждає 3-4% населення Землі. Частота захворюваності на поліноз коливається в залежності від регіональних особливостей флори та соціально-гігієнічних умов і реально в декілька разів перевищує статистичний показник звертання громадян в приводе цього алергозу у амбулаторно-поліклінічні заклади [Федосеев Г.Б. и др., 1984; Сидоренко Е.Н., 1991].

Відомо біля 500 видів рослин, пилюк котрих здатний викликати алергічні реакції, однак в багатьох регіонах головною причиною полінозу є пилюк амброзії - однорічної трав'янистої рослини з родини складноцвітних. Батьківщина амброзії - Північна Америка, але зустрічається вона значно ширше. В Росії амброзію вперше було знайдено на околицях Ставрополя у 1918 р.; звідти, незважаючи на карантинні заходи, вона поширилась практично по всій території теперішнього СНД. В Україні амброзію знайдено у 1925 р. Зараз зустрічається в Закарпатській, Чернівецькій, Львівській,

Київській, Чернігівській, Сумській, Вінницькій, Черкаській, Полтавській, Харківській областях, республіці Крим. Значно розповсюджена в Донецькій, Луганській, Кіровоградській, Одеській, Миколаївській, Днепропетровській, Запорізькій областях. Активно поводить себе у степовій та лісостеповій зонах і виявляє тенденцію повільного проникнення на північ, витісняючи місцеві види рослин [Никитин В. В., 1983].

Амброзія відноситься до вітросапильних рослин; вона цвіте в серпня по жовтень, виробляючи за цей час велику кількість пилку. Дрібний, легкий пилок амброзії відрізняється виключно високою алергенністю та раєноситься вітром на великі відстані, викликаючи масові алергози. Досить високу алергенність мають вегетативні частини рослини [Adarval M. K., 1984; Адо В. А., 1991].

За кордоном вивчення алергенних властивостей пилку амброзії почалося більш ніж 50 років тому. Уже в перших дослідженнях було встановлено, що алергенну властивість має білкова фракція пилку. На теперешній час у пилку різних видів амброзії ідентифіковано більш як 15 алергенів білкової природи [Underdown B. et al., 1966; Adolphson C. et al., 1978; Hussain R. et al., 1977, 1979, 1981; King T. P. et al., 1962, 1964; Lowenstein H. et al., 1978; Яегер Л., 1990]. Однак слід відзначити, що наведені дані в основному відносяться до алергенів пилку амброзій короткої та гігантської. Алергенний склад пилку амброзії полинолистої, найбільш широко розповсюдженої на території України та СНД, вивчений недостатньо. Крім того відомо, що пилок одного і того ж виду рослин, які зростають в різних регіонах, може відрізнятися як за алергенною активністю, так і за спектром алергенів [Радунская С. Ф. и др., 1984; Беклемишев Н. Д. и др., 1985; Фрадкин В. А., 1991].

В доступній нам вітчизняній літературі ми не виявили повідомлень щодо успішних спроб ідентифікації та виділення індивідуальних алергенів з пилку амброзії полинолистої. Між іншим, розвиток техніки фракціювання алергенів відноситься до найважливіших напрямків сучасної алергології, оскільки очищені алергени можуть з успіхом використовуватися як в наукових дослідженнях, так і в лікувально-діагностичній роботі [Райкіс Б. Н. и др., 1987; Фрадкин В. А., 1991].

Існуючі способи отримання алергенних екстрактів з пилку амброзії (зокрема, найбільш часто використовуєий метод А. Кока) не враховують особливостей виділення білків з клітин рослини [Скоупс Р., 1985; Антонов Ю. А. и др., 1990], наслідком чого можуть бути постекстракційна модифікація алергенів, яка приводить до зменшення специфічної активності алергенних екстрактів в процесі їх отримання та зберігання.

У зв'язку з цим аналіз алергенного спектру пилку амброзії полинолистої і розробка нових методів виділення та очистки основних пилкових алергенів є надзвичайно актуальною проблемою.

Мета та завдання дослідження. Метою даної роботи є розробка ефективних методів виділення та очистки основних пилкових алергенів амброзії полинолистої, *Ambrosia artemisiifolia* L., а також вивчення специфічної активності очищених алергенів.

Виходячи з мети дослідження були поставлені наступні завдання:

- вивчити особливості екстрагування алергенів з цілих та зруйнованих пилкових зерен;
- дослідити вплив деяких протективних додатків на стабільність отриманих алергенних екстрактів (АЕ);
- вивчити фізико-хімічні характеристики білків, які екстра-

- гуються в пилку амброзії полинолистої та ідентифікувати основні пилкові алергени;
- провести порівняльний аналіз АЕ, отриманих з пилку амброзії полинолистої, яка росте в різних регіонах;
 - розробити ефективні методи очистки основних пилкових алергенів;
 - дослідити *in vitro* специфічну активність очищених алергенів.

Наукова новизна результатів дослідження

1. Вперше вивчені білковий та алергенний склад, а також специфічна активність АЕ, отриманих з пилку амброзії полинолистої, яка зібрана в різних регіонах.
2. Вивчені особливості екстракції алергенів з цілих та агульонованих пилкових зерен. За результатами експериментів модифікована технологія отримання АЕ з пилку амброзії полинолистої, що дозволило суттєво скоротити часові витрати, збільшити вихід білку та підвищити специфічну активність цільового продукту.
3. Встановлено, що введення до складу екстрагуючого буферу деяких протективних додатків помітно підвищує стабільність АЕ в умовах тривалого зберігання при $+4^{\circ}\text{C}$.
4. Вивчені фізико-хімічні властивості білків, які містяться у пилку амброзії полинолистої. Методом імуноблотингу з використанням пуду сироваток крові сенсibilізованих хворих ідентифіковані основні пилкові алергени.
5. Розроблена методика очистки 3-х основних алергенів пилку амброзії полинолистої. На відміну від вже відомих способів очистки амброзійних алергенів, запропонована методика відрізняється високою ефективністю та низькою трудомісткістю.
6. Досліджена специфічна активність очищених по запропоно-

ваній методиці алергенів в реакціях *in vitro*.

Практична значимість та втілення в практику

1. Матеріали дисертаційної роботи використовуються у навчальному процесі при читанні лекцій та проведенні практичних занять на кафедрі мікробіології, вірусології та імунології Кримського медичного інституту (акт запровадження).

2. Фрагмент праці захищений авторським свідомством "Засіб для виготовлення градієнту щільності при фракціонуванні нейтрофілів та еозинофілів" (позитивне рішення від 25. 09. 1994 р. за заявою N 6017323/14 [0669821]).

3. За матеріалами досліджень розроблено та втілено 8 раціоналізаторських пропозицій.

4. На базі малого спільного підприємства "Лабораторія імунологічних та вірусологічних досліджень (ЛІВД) організовано дослідне виробництво очищених алергенів пилку амброзії, які призначені для використання *in vitro* (акт запровадження).

Апробація роботи.

Результати проведених дослідів доповідалися та обговорювалися на спільному засіданні кафедри мікробіології, вірусології та імунології, і проблемної комісії "Інфекційні захворювання та мікробіологія" Кримського медичного інституту; міжнародному симпозиумі з алергології та клінічної імунології "Regulation and Clinical Significance of IgE" (Москва, 1990 р.); XII Українському республіканському з'їзді мікробіологів, епідеміологів та паразитологів (Харків, 1991 р.); науково-практичній конференції "Актуальні питання мікробіології, епідеміології та імунології інфекційних захворювань" (Харків, 1993 р.); I Установчому з'їзді Українського мікробіологічного товариства (Одеса, 1993 р.).

Публікації. За матеріалами дисертації опубліковано 10 робіт.

Обсяг та структура роботи. Дисертація викладена на 147 сторінках друкованого тексту, вклучає 33 малюнки, 9 таблиць, і складається з вступу, огляду літератури, експериментальної частини (матеріали та методи досліджень, результати досліджень та їх обговорення в 4-х розділах), висновків, списку цитованої літератури, додатку. Бібліографія представлена 137 джерелами, з них 70 - на іноземних мовах.

ЗМІСТ РОБОТИ

Основні методичні підходи до вирішення поставлених завдань. В роботі використовували пилок амброзії полинолистої, *Ambrosia artemisiifolia* L., люб'язно наданий професором В.М. Райкісом (Ставрополь), а також зібраний у 1990-1992 рр. на околицях м. Симферополя. Мишині моноклональні антитіла (МКАТ) до ζ -ланцюга IgE людини були люб'язно надані професором В.Б. Климовичем (С.-Петербурґ); кроляча гіперімунна антисироватка до пилку амброзії - професором В.Б. Гервазієвою (Москва); сироватка крові хворих на алергію до пилку амброзії - доктором С.М. Ясинецькою (пульмонологічне відділення містурбдіспансеру м. Симферополя.

В залежності від мети експерименту алергени екстрагували з цілих або аруйнованих пилкових зерен. Очищення АЕ від низькомолекулярних компонентів проводили за допомогою гел'є-фільтрації на Acrylex P-6. Індивідуальні алергени виділяли при допомозі гідрофобної хроматографії на Phenyl-агарозі та ісообмінної хроматографії на DEAE-агарозі за розробленою автором методикою (Гордиенко А.И., 1992).

Концентрацію білку в АЕ та хроматографічних фракціях визначали методом Бредфорд. Аналітичний електрофорез (ЕФ) проводили в блоках градієнту пористості (7-18%) поліакриламідного гелю (ПААГ)

в нативних [Ornstein L., 1964; Davis B. J., 1964] та денатуруючих [Laemmli U. K., 1970] умовах; ізоелектрофокусування (ІЕФ) - в 7% ПААГ в присутності 2.5% амфолітів-носіїв в діапазоні 4-9 рН [Ригетті П., 1986].

Кон'югування МКАТ проти ξ -ланцюга ІgЕ людини з біотином виконували за методом Хсу С.-М., 1988. Алергенспецифічні ІgЕ-антитіла (ІgЕ-АТ) у сироватці крові хворих на алергію до пилку амброзії визначали за допомогою розробленої нами раніше імуноферментної тест-системи з біотин-стрептавідиновим підсиленням сигналу (Гордиєнко А. І. і др., 1993). Імуноблотинг проводили за методом Towbin H. et al., 1979. Для вивчення специфічної активності та перехресної реактивності очищених алергенів в реакціях зв'язування та інгібування зв'язування ІgЕ-АТ з пулу сироваток крові сенсibilізованих хворих використовували метод Adkinson N. F., 1980. Для порівняльного аналізу специфічної активності АЕ та виділених алергенів застосовували також метод непрямі деградуляції тканинних базофілів пацків (НДТБ) [Фрадкін В. А., 1991].

Статистичну обробку отриманих результатів проводили загальноприйнятими методами [Тейлор Дж., 1985; Лакін Г. Ф., 1990; Дьяков В. П., 1991], використовуючи мікроЕОМ "Електроніка МК-52" та ПЕОМ "ЕС-1851".

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Оптимізація методу отримання алергенних екстрактів з пилку амброзії. Як правило, для екстракції пилкових алергенів використовувать метод А. Кока [Фрадкін В. А., 1991]. Цей метод простий, проте не враховує особливостей виділення білків з клітин рослин. Наслідком цього може бути ініціювання ряду небажаних фізико-хімічних процесів, до котрих, зокрема, відносяться: міжмолекулярна взаємодія білків з ендогенними фенольними сполуками

(пігменти і т.і.), яка призводить до утворення малорозчинних комплексів, стабілізованих водневими зв'язками; адсорбція білками фенольних сполук за рахунок гідрофобних взаємодій; ковалентна модифікація білків хінонами, які утворюються в результаті ферментативного (в наслідок дії ендогенних фенолоксидаз) та неферментативного (яке каталізується іонами двовалентних металів) окислення фенольних сполук; деградація білків ендогенними протеазами (Скоупс Р., 1985; Антонов Ю.А., 1990). Все це призводить до зниження специфічної активності алергенів, які виділяються. Крім того, з цілого пилку рієні алергени екстрагуються в неординарно ефективнішому (Hussain R., 1980; Marsh D.G., 1981), тому для отримання АЕ, який би містив якомога більшу кількість активних компонентів, необхідна тривала (до 72 год) екстракція.

Нами були вивчені можливості оптимізації процесу отримання АЕ з пилку амброзії шляхом механічного руйнування пилкових зерен для збільшення швидкості виходу алергенів в екстракт, а також введенням в екстрагуючий буфер деяких протективних додатків.

Для екстракції алергенів використали 0.05 М фосфатний буфер, рН 7.4, який містить 1% NaCl; 0.02% KCl та 0.02% NaN_2 (буфер 1). Для усунення неферментативного окислення ендогенних фенольних сполук, яке каталізується іонами двовалентних металів, та захисту SH-груп екстрагованих білків, у склад буферу 1 були додатково залучені комплексоутворюючий (EDTA-Na_2) та сульфгідрильний (дітіотреїтол, ДТТ) реагенти в концентрації 0.5 та 1.0 мМ відповідно; для інгібування ендогенних протеаз - фенілметилсульфонілфторид (ФМСФ) в концентрації 1 мМ (буфер 2).

АЕ з цілого пилку отримували за методом А. Кока, струшуючи 250 мг пилку у 10 мл буферу 1 на протязі 48 год при $+4^\circ\text{C}$ (метод 1). АЕ із зруйнованих пилкових зерен готували, гомогенізуючи 5 кв

250 мг пилку у 10 мл буферу 1 або 2 за допомогою гомогенізатора Даунса, та інкубувати гомогенат 1 год при $+4^{\circ}\text{C}$ (метод 2). Нерозчинні компоненти осаджували за допомогою центрифуги при 3600 г протягом 10 хв.

Концентрація білку та ЦДТВ для АЕ, який отриманий методом 1, складає відповідно 0.30 ± 0.02 мг/мл і 1.18 ± 0.12 ; методом 2 - 0.62 ± 0.03 мг/мл і 2.22 ± 0.27 ($p < 0.05$). Оскільки величина ЦДТВ відображує специфічну алергенну активність АЕ, що тестується [Schwartz G. et al., 1968; Фрадкін В.А., 1991], ці результати дають підстави говорити про більш високу алергенність АЕ, який отриман методом 2, що визначається більш повним виділенням алергенів з вихідної сировини. Вихід білку, у перерахунку на суху вагу пилку, для методу 1 складає $1.06 \pm 0.14\%$, для методу 2 - $1.84 \pm 0.14\%$ ($p < 0.05$). При використанні методу 2 весь білок, що екстрагується, одержується в пилку вже в першу годину екстрагування, тоді як у випадку використання методу 1 для цього необхідно не менше 48 год.

Порівняльний аналіз білкових спектрів АЕ, які виготовлені за методами 1 та 2, свідчить, що вони відрізняються як за молекулярними масами (ММ) деяких компонентів, так і за відносним вмістом окремих фракцій. В АЕ, які отриман за методом 1, відсутні білки з ММ більш як 42.0 кДа та фракції з ММ 18.7, 20.0, 22.0, 27.0 кДа, а також деякі мінорні компоненти. Відносна кількість основних фракцій з ММ 35.0-39.0 кДа (алергени АгЕ та АгК) в ньому значно менше, ніж в АЕ, отриманому за методом 2.

Для вивчення залежності стабільності АЕ від складу екстрагуючого буферу АЕ, виготовлені за методом 2 з використанням буферу 1 (без протективних додатків) та 2 (з протективними додатками), зберігали при $+4^{\circ}\text{C}$ на протязі 6 міс. Безпосередньо після виготов-

лення та через кожні 1.5 міс зберігання, а АЕ відбирали аліквоти, в котрих визначали концентрацію білку та специфічну активність в реакції НДТБ. В АЕ, отриманому з використанням буферу 2, концентрація білку та ЦДТБ на протязі контрольного терміну зберігання незначно зменшуються, складаючи через 1.5 міс відповідно $94.4 \pm 4.9\%$ та $93.5 \pm 8.5\%$ від вихідного рівня; через 3 міс - $93.5 \pm 4.1\%$ та $91.8 \pm 8.0\%$; через 4.5 міс - $89.7 \pm 4.2\%$ та $88.4 \pm 7.8\%$; через 6 міс - $87.9 \pm 3.5\%$ та $87.5 \pm 8.1\%$. В АЕ, який отримано при використанні буферу 1, вміст білку та ЦДТБ при зберіганні знижуються значно швидче, складаючи через 1.5 міс відповідно $90.8 \pm 3.4\%$ та $87.6 \pm 7.6\%$ від початкової величини; через 3 міс - $72.5 \pm 3.7\%$ та $75.4 \pm 8.4\%$; через 4.5 міс - $53.2 \pm 4.4\%$ та $49.8 \pm 7.7\%$; через 6 міс - $48.6 \pm 4.7\%$ та $42.6 \pm 7.1\%$.

ЕФ у ПААГ встановлено, що за відсутності протективних додатків в АЕ має місце виражена деградація деяких білкових фракцій, що проявляється у зниженні числа високомолекулярних та збільшенні кількості низькомолекулярних компонентів. Більш швидко зменшення вмісту білку, зниження специфічної активності та деструкція білкових компонентів в АЕ, який не містить протективних додатків, обумовлені, ймовірно, дією ендогенних протеаз та постекстракційною модифікацією алергенів продуктами окислення фенольних сполук пилку амброзії.

Таким чином, руйнування пилкових зерен амброзії в процесі екстракції алергенів дозволяє в 1.7 рази збільшити вихід білку (у перерахунку на суху вагу пилку), у 1.9 рази підвищити специфічну активність АЕ в реакції НДТБ та більш ніж у 40 разів прискорити процедуру отримання АЕ. Введення у склад екстрагуючого буферу ДТТ, ЕДТА- Na_2 та ФМСФ в концентраціях 1, 0.5 та 1 мМ відповідно істотно підвищує стабільність АЕ в умовах тривалого зберігання

при +4° С.

АЕ, які отримуються за стандартною методикою з пилку одного і того ж виду рослин, які ростуть в різних регіонах, можуть істотно відрізнятися і за антигенним складом, і за алергенною активністю [Радунская С. Ф., 1984; Фрадкин В. А., 1991]. Проте проведений нами порівняльний аналіз АЕ, отриманих з пилку амброзії полинолистої, який був зібран на околицях Симферополя та Ставрополя, засвідчив (табл. 1), що ці АЕ не відрізняються одне від одного за жодним з досліджених параметрів; вони мають практично однаковий білковий склад, будь яких суттєвих відмінностей у спектрі білкових компонентів не виявлено. Вивчення алергенного спектру вказаних АЕ методом імуноблотингу також підтвердило їх ідентичність.

Таблиця 1.

Деякі показники АЕ, виготовлених з пилку амброзії полинолистої, зібраної в різних регіонах

Місце збору пилку	Концентрація білку в АЕ, мг/мл	Концентрація вуглеводів в АЕ, мг/мл	Величина ІДТЗ
Симферополь	0.54 ± 0.03	4.72 ± 0.20	2.27 ± 0.26
Ставрополь	0.52 ± 0.03	4.77 ± 0.24	2.13 ± 0.21

Примітка : в таблиці наведені середні результати 5 експериментів

Розробка методів очистки основних алергенів пилку амброзії.
Відомі способи очистки основних алергенів пилку амброзії були запропоновані 15-20 років тому і ґрунтуються на поєднанні методів гель-фільтрації, іонообмінної хроматографії та фракціонування суль-

фатом амонію [King T.P. et al., 1962, 1964; Underdown B. et al., 1969]. Ці методи нараховують до 16 проміжних етапів та відрізняються тривалістю, трудомісткістю та низькою ефективністю. Проте поява нових хроматографічних матеріалів та прийомів [Остерман Л.А., 1985; Скоупс Р., 1985] відкриває широкі перспективи для їх удосконалення. Метою подальших експериментів була розробка методів очистки основних алергенів пилку амброзії, більш простих та ефективних у порівнянні з запропонованими раніше.

Попередньо нами були вивчені деякі фізико-хімічні властивості білків, що входять до складу АЕ з пилку амброзії. ЕФ у градієнті пористості (7-18%) ПААГ в присутності ДСН та 2-МЕ встановлено, що АЕ надто гетерогенний за складом та містить значну кількість (більше ніж 30) білків з ММ від 6 до 100 кДа. Більш високим відносним вмістом відрізняються фракції з ММ 61, 35.7, 37.8, 19.5, 18.8 кДа, а також дві групи близько розташованих білків з ММ 22 - 27 та 12 - 17.5 кДа відповідно. Вказані компоненти складають основу кількості білку АЕ. Має місце також велика кількість мікрних фракцій. З результатів фракціонування АЕ ЕФ у ПААГ при рН 8.3 у неденатуруючих умовах виходить, що білки, які екстрагуються з пилку амброзії, схильні до спонтанної агрегації та не можуть бути ефективно розділені в поданій системі. Цим, очевидно, пояснюються невдачі спроби виділення окремих алергенів пилку амброзії методом гель-фільтрації на сефадексах G-75, G-100 і G-200 [Остроумов А.И. и др., 1979; Иллотович Н.А., 1985; Райкис В.Н. и др., 1980, 1987]. Ізоелектричні точки (pI) білків АЕ визначали ІЕФ у ПААГ в денатуруючих (в присутності 3 М сечовини та 2% детергенту Nonidet P-40) та нативних умовах. Більша частина білків АЕ фокусується в кислій області рН (pI окремих компонентів відповідно дорівнюють 4.2, 4.4, 4.7, 5.0 (дві фракції з близькими pI), 5.3, 5.5, 5.7,

5.8, 6.5). Крім того, тут присутні і основні білки (рі 9.4, 8.6).

Методом імуноблотингу в'ясовано, що здатність зв'язувати IgE-AI з пулу сироваток крові хворих на алергію до пилку амброзії мають білки АЕ з ММ 89.9, 71.4, 64.6, 61, 54, 37.8, 35.7, 31.6, 25.6, 19.5, 18.3, 15.1, 12 кДа, а також група близько розташованих білків з ММ у межах 26.9 - 29.1 кДа. Алергени з ММ 37.8, 35.7 та 12 кДа складають значну частку всього екстрагованого білку та, судячи з літературних джерел, відповідають пилковим амброзійним алергенам AgE, AgK та Ra3. Отримання цих алергенів у високоочищеному стані було метою наших подальших експериментів.

Очистку АЕ від низькомолекулярних домішок проводили при допомозі гель-фільтрації на колонці з Acrylex P-6, яка була врівноважена 0.1 М фосфатним буфером, що містить 1% NaCl, 0.02% KCl, 0.02% NaN_3 та 1 мМ ЕДТА- Na_2 (буфер 3). Фракція високомолекулярних компонентів АЕ, яка містить білки та, можливо, інші біополімери з ММ більш як 6 кДа (фракція А), елюється у вільному об'ємі колонки. Фракція низькомолекулярних компонентів АЕ (фракція В) має значну адсорбцію до цього сорбенту ($K_{av} \gg 1$) та виходить у об'ємі, котрий значно перевищує повний об'єм колонки.

В табл. 2 наведені деякі показники фракції А та похідного АЕ. Незважаючи на те, що концентрація білку у фракції А приблизно у 3.4 рази менша, ніж у вихідному АЕ, що обумовлено невідворотним розведенням АЕ протягом хроматографічного циклу, сумарна кількість білку, внесеного у колонку та елюованого з неї у складі фракції А, залишається незмінною ($p < 0.05$). Ємист вуглеводів та співвідношення вуглеводи/білок у фракції А відповідно в 9.1 та 2.7 рази нижче, ніж у вихідному АЕ, що свідчить про високу ефективність гель-фільтрації на Acrylex P-6 з метою вилучення низькомолекулярних компонентів АЕ. ЕФ у ПААГ встановлено, що ні

за якісним складом, ні за відносним вмістом окремих компонентів фракція А не відрізняється від вихідного АЕ.

Таблиця 2.

Оцінка ефективності очистки АЕ з пилку амброзії від низькомолекулярних компонентів хроматографією на Acrylex P-6

Характеристика АЕ	Об'єм, мл	Концентрація	Концентрація	Вуглеводи	Сумарна
		білку, мг/мл	вуглеводів, мг/мл	білок	кількість білку, мг
До очистки	3.8±0.13	0.53 ± 0.03	3.20 ± 0.20	5.9	2.05±0.14
Після очистки	12.2±0.8	0.16 ± 0.02	0.35 ± 0.03	2.2	1.35±0.29

Примітка : в таблиці наведені середні результати 5 експериментів

Наступне фракціонування білків АЕ здійснювали за допомогою аєотнофазової гідрофобної хроматографії на Phenyl-агарозі. В попередніх експериментах було встановлено, що практично повна адсорбція білків АЕ на Phenyl-агарозі відбувається при концентрації сульфату амонію у рідкій фазі, яка дорівнює 1.365 М. Тим часом, така концентрація сульфата амонія недостатня для преципітації білків, які містяться у АЕ.

Колонку с Phenyl-агарозою врівноважували буфером 3, який містить 1.365 М сульфату амонію (буфер 4) та наносили на неї фракцію А, в котру попередньо додавали сульфат амонію до кінцевої концентрації 1.365 М. Білки, які адсорбувалися, елювали за східчастим градієнтом зниження концентрації сульфата амонія (0.780 - 0.585 - 0.390 - 0.195 - 0.000 М). В'ясовано, що за сту-

пенем гідрофобності білки АЕ можуть бути розділені на дві фракції, які позначені як С та D. Білки фракції С, менш гідрофобні, починають десорбуватися з Phenyl-агарози при зменшенні концентрації сульфата амонія у рідкій фазі до 0.780 М. Повна елюція відбувається у 0.390 М розчині сульфата амонія в буфері 3. Білки фракції D, більш гідрофобні, починають десорбуватися з колонки при 0.195 М концентрації сульфата амонія у розчині, та повністю елюються буфером 3, який не містить сульфата амонія.

Білки, які присутні у фракціях С та D, розрізняються як MM, так і pI. Фракція С містить два основних компоненти з MM 37.8 та 1. кДа (AgE та Ra3), а також мінорні білки з MM 58.3, 56.9, 44.8, 38.7, 36, 32, 29.8, 28.1, 26.8, 25.4, 24.6, 22.3, 21.3, 20.3, 19.3 кДа. Білки фракції С фокусуються як в кислій області рН (pI 4.4, 4.9, 5.1, 5.26-5.30, 5.4, 5.5, 6.0, 6.2), так і у лужній (pI 8.4). У фракції D основним компонентом є білок з MM 35.7 кДа (AgK); крім нього, у невеликій кількості присутні білки з MM 54.7, 49.7, 38.3, 19.8, 19.2, 18.5, 18.3 кДа. Ізоелектричні точки білків фракції D знаходяться у кислій області рН (pI 5.0, 5.6, 5.7, 6.0, 6.1, 6.2, 6.3, 6.4, 6.7). Алергени AgE та Ra3 входять до складу фракції С, AgK - до складу фракції D. Фракція С містить $21.3 \pm 3.7\%$ усього білку АЕ, фракція D - $9.7 \pm 1.4\%$. Під час фракціонування має місце значне збільшення відносного вмісту AgE та Ra3 у відповідних фракціях та значна очистка AgK.

Подальшу очистку алергенів AgE, Ra3 та AgK проводили за допомогою іонообмінної хроматографії на DEAE-агарозі. Фракції С та D переводили в 25 мМ Трис-HCl, рН 7.9 (буфер 5) гель-фільтруванням на колонці з Acrylex P-6, зрівноваженій цим же буфером. На колонку з DEAE-агарозою, зрівноваженою буфером 5, наносили підготовлену фракцію (С або D) та елювали способом східчатого збільшення

градієнту концентрації NaCl (0.00 - 0.05 - 0.10 - 0.15 - 0.20 M). Отримані субфракції (C-0, C-1, C-2, C-3, C-4 та D-0, D-1, D-2, D-3, D-4) аналізували ЕФ у ПААГ у присутності ДСН та 2-МЕ.

На відміну від решти білків фракції С, РаЗ в буфері Б має негативний заряд молекули (рІ 8.4-8.6). Тому він не сорбується на даному іонообміннику та виходить з колонки у складі субфракції С-0 вільним від інших білків, присутніх у фракції С. АгЕ в цих же умовах адсорбується на DEAE-агарозі та елюється 0.05 M NaCl в буфері Б практично гомогенним у складі субфракції С-1. Субфракції С-2, С-3 та С-4 містять білки, які елюються з колонки за більш високих концентрацій NaCl (0.1 - 0.2 M). АгК, незважаючи на те, що він має рІ у кислій області рН, у вказаних умовах на колонці з DEAE-агарозою не сорбується та виходить вільним від домішкових білків у складі субфракції D-0. Субфракції D-1, D-2, D-3 та D-4 включають білки фракції D, які сорбуються на колонці в буфері для посадки та елюються за збільшенням градієнта концентрації NaCl (0.05 - 0.2 M).

Таким чином, за розробленою нами методикою отримані у високоочищеному стані три основних алергени пилку амброзії - АгЕ, АгК та РаЗ. Вихід цих алергенів склав відповідно 5.1 ± 0.6 , 2.2 ± 0.3 і $0.47 \pm 0.06\%$ від усього білку АЕ.

Вивчення специфічної активності алергенних фракцій, виділених з пилку амброзії. В табл. 3 наведені результати тестування виділених нами алергенних фракцій пилку амброзії в реакції НДТБ. Фракція А, яка отримана при допомозі гелі-фільтрації вихідного АЕ на Acrylex P-6 і містить тільки високомолекулярні компоненти АЕ, виявляє таку ж специфічну активність в реакції НДТБ, як і вихідний АЕ ($p > 0.05$). Фракція В, що отримана аналогічно і складається лише з низькомолекулярних компонентів АЕ, не активна в

Таблиця 3.

Активність вихідного АЕ та алергенних фракцій, отриманих на різних етапах очистки, в реакції НДТВ

Фракція	Спосіб отримання	НДТВ
Вихідний АЕ	Гомогенізація пилку у буфері 2	2.16 ± 0.17
А	Хроматографія вихідного екстракту на Acgilex F-6; високомолекулярні компоненти	2.21 ± 0.17
В	----"----; низькомолекулярні компоненти	0.31 ± 0.05
С	Хроматографія фракції А на Phenyl-Агарозі; елюція 0.390 М сульфатом амоніа в буфері 3	2.81 ± 0.16
Д	----"----; елюція буфером 3	2.68 ± 0.18
С-0 (Rα3)	Хроматографія фракції С на DEAE-Агарозі; елюція буфером 5	2.08 ± 0.15
С-1 (AgE)	----"----; елюція 0.05 М NaCl	2.79 ± 0.22
С-2	----"----; елюція 0.10 М NaCl	0.34 ± 0.05
С-3	----"----; елюція 0.15 М NaCl	0.53 ± 0.08
С-4	----"----; елюція 0.20 М NaCl	0.42 ± 0.05
Д-0 (AgK)	Хроматографія фракції Д на DEAE-Агарозі; елюція буфером 5	2.67 ± 0.11
Д-1	----"----; елюція 0.05 М NaCl	0.44 ± 0.05
Д-2	----"----; елюція 0.10 М NaCl	0.62 ± 0.10
Д-3	----"----; елюція 0.15 М NaCl	0.63 ± 0.05
Д-4	----"----; елюція 0.20 М NaCl	0.50 ± 0.10

Примітка : в таблиці наведені середні результати 3 експериментів

ЛНБ ім. В. Стефаніка
АН України

реакції НДТВ. Фракції С та D, які виділені при допомозі гідрофобної хроматографії фракції А на Phenyl-агарозі, мають високу активність в реакції НДТВ, причому вона у середньому в 1.3 рази вища, ніж у вихідного АЕ ($p < 0.05$). З субфракцій, отриманих з допомогою іонообмінної хроматографії фракцій С та D на DEAE-агарозі, специфічну активність в реакції НДТВ мають лише субфракції С-0, С-1 та D-0, які містять відповідно алергени Ra3, AgE та AgK. Для субфракцій С-1 та D-1 величина ЦДТВ у середньому в 1.3 рази вища, а для субфракції С-0 - у 1.1 рази нижча, ніж у вихідного АЕ ($p < 0.05$).

Для оцінки та порівняльного аналізу активності вказаних алергенних фракцій в реакціях зв'язування (інгібування зв'язування) IgE-АТ в сироваток крові хворих на алергію до пилку амброзії спочатку було необхідно дослідити особливості адсорбції білків АЕ на поверхні твердої фази; в якості останньої використовували полістиролові планшети ВНДІ "Медполімер" (С.-Петербург). Встановлено, що оптимальна сенсibiлізація поверхні полістиролових планшетів відбувається при рН 9.8 та концентрації білку в АЕ, яка дорівнює 5 мкг/мл. Після 12-годинної інкубації АЕ з вказаною концентрацією білку у лунках планшету відбувається практично повне насичення центрів зв'язування; при цьому кількість адсорбованого білку досягає максимальної величини і далі не змінюється. Практично сенсibiлізацію планшетів зручно проводити на протязі 18-24 год при +4°С.

З даних, наведених в табл. 4 видно, що зі збільшенням ступеня очистки AgK та AgE їх IgE-зв'язуюча активність зростає і на заключному етапі відповідно у 9.3 та 3.9 рази перевищує IgE-зв'язуючу активність вихідного АЕ ($p < 0.001$). Проте IgE-зв'язуюча активність очищеного Ra3 у 1.8 рази нижча, ніж активність вихідного

Таблиця 4.

IgE-зв'язуюча активність вихідного АЕ та хроматографічних фракцій, отриманих на різних етапах очистки

Фракція	IgE-зв'язуюча активність, мкг/мл	Відношення до активності вихідного АЕ
Вихідний АЕ	0.74 ± 0.06	1
А	0.37 ± 0.04	2.0
В	---	---
С	0.13 ± 0.02	6.7
Д	0.28 ± 0.03	2.6
С-0 (РаЗ)	1.31 ± 0.08	0.60
С-1 (АгЕ)	0.09 ± 0.01	9.3
С-2	---	---
С-3	---	---
С-4	---	---
Д-0 (АгК)	0.19 ± 0.02	3.9
Д-1	---	---
Д-2	---	---
Д-3	---	---
Д-4	---	---

Примітка: 1. В таблиці надані середні результати 4 дослідів
2. Прочерк (---) означає відсутність активності

АЕ. Це, ймовірно, визначається його меншим алергенним потенціалом. Фракції С-2, С-3, С-4 та D-1, D-2, D-3, D-4 IgE-зв'язуючої активності не виявляють; очевидно, вони містять неактивні в алергенному плані білки. Такий розподіл активності добре корелює з результатами тестування вказаних фракцій в реакції НДТБ (табл. 3).

Таблиця 5.

Перехресна активність очищених алергенів пилку амброзії в реакції інгібування зв'язування IgE-АТ з пилку сироваток крові сенсibilізованих хворих.

Алерген, який використаний для сенсibilізації твердої фази	Концентрація алергену, при якій відбувається 50%-е інгібування зв'язування IgE-АТ, мкг/мл		
	С-0	С-1	D-0
Фракція С-0 (RaЗ)	2.2±0.2	---	---
Фракція С-1 (AgE)	---	1.3±0.1	275.2±21.
Фракція D-0 (AgK)	---	133.9±15.6	1.7±0.2

Примітка: 1. В таблиці надані середні результати 4 дослідів

2. Прочерк (---) означає відсутність інгібування

У табл. 5 наведені результати експериментів по визначенню перехресної активності фракцій С-0, С-1 та D-0 в реакції інгібування зв'язування IgE-АТ з пилку сироваток крові хворих на алергію до пилку амброзії. Зв'язування IgE-АТ з іммобілізованою на твердій фазі фракцією С-1 інгібувалося тільки фракцією D-0; для 50%-ного

інгібування концентрація фракції D-O повинна була бути у 166 разів вища, ніж концентрація фракції C-1, яка викликає такий самий ефект. У свою чергу зв'язування IgE-AT з іммобілізованою фракцією D-O інгібувалося на 50% тільки фракцією C-1, причому у концентрації, яка у 106 разів перевищує необхідну для цього концентрацію фракції D-O. Зв'язування IgE-AT з іммобілізованою фракцією C-O не інгібувалося фракціями C-1 та D-O навіть у концентраціях, що у 200 разів перевищують потрібну для цього концентрацію фракції C-O. Низька перехресна реактивність або практично повна її відсутність у алергенних фракцій, очищених за розробленою нами методикою, свідчить про високий ступень їх очистки.

Цікаво, що виділення з АЕ компонентів з ММ менше 6 кДа (фракція А) призводить до 2-разового підвищення його IgE-зв'язуючої активності ($p < 0.05$), хоча в реакції НДТБ активність фракції А статистично достовірно не відрізняється від активності вихідного АЕ. Ймовірно, це пов'язано з тим, що низькомолекулярні домішки, які присутні у вихідному АЕ і самі по собі не мають алергенності, конкурують за центри зв'язування на твердій фазі з алергенними компонентами. Наслідком такої конкуренції може бути зниження сумарної кількості алергенів, які зв'язались з твердою фазою, та пропорційне цьому зменшення IgE-зв'язуючої активності вихідного АЕ. У спеціальному експерименті нами було вивчено вплив низькомолекулярних компонентів АЕ на процес адсорбції білків пилку амброзії на твердій фазі. У всьому діапазоні досліджених концентрацій оптична щільність кінцевого продукту реакції в лунках, сенсibilізованих фракцією А, була у середньому в 1.5 рази вища, ніж у лунках, сенсibilізованих вихідним АЕ. Отже, низькомолекулярні домішки, які містяться у неочищеному АЕ з пилку амброзії, дійсно можуть конкурувати з білками АЕ за центри зв'язування на твердій фазі.

В И С Н О В К И

1. Заміна струшування пилку амброзії гомогенізацією пилку в цьому ж буфері за допомогою гомогенізатора Даунса дозволяє у 1.8 рази збільшити вихід білку у перерахунку на суху вагу пилку, у 1.9 рази підвищити відносний вміст основних алергенів та специфічну активність отриманих алергенних екстрактів, а також більш ніж у 40 разів прискорити процедуру екстракції.

2. Включення до складу екстрагуючого буферу ДТТ, ЕДТА- Na_2 та ЗМОФ в концентраціях відповідно 1, 0.5 та 1 мМ, суттєво підвищує стабільність алергенних екстрактів в умовах тривалого збереження при $+4^\circ\text{C}$.

3. Алергенні екстракти, які виготовлені з пилку амброзії полинолістої, зібраного у Сімферполі та Ставрополі, не відрізняються за білковим та алергенним спектрами і виявляють однакову специфічну активність в реакціях *in vitro*.

4. За допомогою електрофоретичних методів у поєднанні з методом імуноблотингу; вивчені фізико-хімічні властивості алергенів пилку амброзії полинолістої. Розроблено просту та ефективну методику виділення та очистки 3-х основних пилкових алергенів.

5. Очищені за розробленою методикою алергени виявляють високу специфічну активність в реакціях *in vitro*. Результати вивчення перекресної реактивності цих алергенів в реакції інгібування зв'язування IgE-антитіл з сироваток крові сенсibilізованих хворих підтверджують високий ступень їх очистки.

6. При сенсibilізації полістиролових планшетів неочищеним екстрактом білків пилку амброзії низькомолекулярні імунологічно неактивні компоненти екстракту конкурують з алергенами за центри зв'язування на твердій фазі, що необхідно враховувати при прове-

денні різних варіантів твердофазного імунометричного аналізу.

ПЕРЕЛІК РОБІТ, ОПУБЛІКОВАНИХ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

1. Малий К. Д., Гордієнко А. І., Малая Г. Т. Дослідження білків, екстрагованих із пилка амброзії за допомогою електрифоретичних методів // XII Укр. респ. з'їзд мікробіологів, епідеміологів і паразитологів: Тези доповідей. - Київ, 1991. - ч. 2. - С. 27.
2. Гордиенко А. И., Малий К. Д., Кривошеин Ю. С. и др. Имуноферментная тест-система для определения общего и аллергенспецифического IgE с биотин-стрептавидиновым усилением сигнала // Научно-практ. конф. "Актуальные вопросы микробиологии, эпидемиологии и иммунологии инфекционных болезней": Тез. докл. - Харьков, 1993. - С. 234.
3. Гордиенко А. И. Использование гидрофобной и ионообменной хроматографии для выделения аллергенов из пыльцы амброзии // Микробиол. журн. - 1994. - 56, N 2. - С. 61.
4. Гордиенко А. И., Кривошеин Ю. С., Малий К. Д., Климович В. Е., Гервазијева В. Б. Использование моноклональных антител и биотин-стрептавидиновой системы усиления для количественного определения IgE человека // Микробиол. журн. - 1996. - 58, N 2. - С. 58-65.
5. Гордиенко А. И., Кривошеин Ю. С., Тимченко А. С. Оптимизация метода получения аллергенных экстрактов из пыльцы амброзии // Укр. биохим. журн. - 1996. - 78, N 1. - С. 82-85.
6. Гордиенко А. И., Кривошеин Ю. С. Особенности экстрагирования пыльцевых аллергенов амброзии // Проблемы, достижения и перспективы развития медико-биологических наук и практического здравоохранения. - Силферополь, 1995. - С. 87-90.
7. Гордиенко А. И. Белковый и аллергенный спектр пыльцы амброзии полыннолистной // Международн. научн. конф. "Идеи И. И. Мечникова"

- ва и развитие современного естествознания": Тез. докл. - Харьков, 1995. - С. 83-84.
8. Гордиенко А. И. Биологические свойства главных пыльцевых аллергенов амброзии подыннолистной // Там же. - С. 84-85
 9. Гордиенко А. И., Медвецкий Е. Б., Тумасова Е. П., Гордиенко А. И. "Средство для приготовления градиента плотности при фракционировании нейтрофилов и эозинофилов" (Положительное решение от 25.09.1994 г. по заявке на АС N 5017323/14 [066982]).
 10. Gordienko A. I., Malyi K. D., Krivoshein Yu. S. et al. Immunoelectroblotting analysis of serum immunoglobulin E in allergic patients // Int. Symp. on Allergy and Clin. Immunology "Regulation and Clinical Significance of IgE". - Moscow, 1990. - P. 34.

Гордиенко А. И. Иммунобиологические свойства основных пыльцевых аллергенов амброзии подыннолистной.

Диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 14.03.14 - "Иммунология и аллергология". Украинский Национальный Медицинский Университет им. акад. А. А. Богомольца. - Киев, 1996.

Защищается рукопись, в которой представлены результаты изучения белкового и аллергенного состава пыльцы амброзии подыннолистной, *Ambrosia artemisiifolia* L. На основании полученных данных оптимизирована технология получения аллергенных экстрактов из пыльцы амброзии, и разработана высокоэффективная методика выделения и очистки 3-х основных пыльцевых аллергенов. Установлено, что аллергены, получаемые по предлагаемой методике, проявляют высокую специфическую активность в реакциях *in vitro*.

Gordiyenko A. I. Immunobiological Properties of Main Ambrosia artemisiifolia L. Pollen Allergens.

Thesis for Scientific Degree of the Candidate of Biological Sciences in speciality 14.03.14 - Immunology and Allergology. A. A. Bogomolets Ukrainian State Medical University, Kiev, 1986.

Typescript with the results of studies of Ambrosia artemisiifolia L. pollen protein and allergenic composition is being defended. On the basis of the obtained data the technology of allergenic extracts receiving from ambrosia pollen has been optimized and highly-effective technique of three main pollen allergens extracting and purification has been developed. It was found out that the allergens, being received according to the technique, display a high specific activity in "in vitro" reactions.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: амброзія полинолиста, пилков: алергени, виділення та очистка, імунологічні властивості.



AB 34.176

AB 34.176