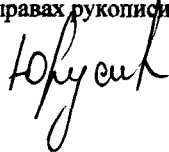


На правах рукописи



РУСТАМЬЯН Юлия Леонидовна

**ИССЛЕДОВАНИЕ БИОЛОГИЧЕСКИХ СВОЙСТВ
АНГИОГЕНИНА МОЛОКА –
ПОЛИФУНКЦИОНАЛЬНОЙ РИБОНУКЛЕАЗЫ**

03.00.04 – биохимия

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Москва – 2005

Работа выполнена в научно-учебном отделе биохимических проблем экологии
Института биохимии им. А.Н. Баха РАН

Научный руководитель:

доктор биологических наук, профессор Г.С. Комолова

Официальные оппоненты:

доктор биологических наук, вед.н.с. Л.И. Ковалев

доктор химических наук, профессор Э.Г. Розанцев

Ведущая организация:

Государственный Научный Центр Российской Федерации Институт медико-биологических проблем РАН

Защита диссертации состоится «25» октября 2005 г. в «11» часов на заседании диссертационного совета К 002.247.01 по присуждению ученой степени кандидата наук в Институте биохимии им. А.Н. Баха РАН по адресу: 119071, Москва, Ленинский проспект, 33, корп. 2.

С диссертацией можно ознакомиться в Библиотеке биологической литературы по адресу: 119071, Москва, Ленинский проспект, 33, корп.1.

Автореферат разослан «23» «сентября» 2005г.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
кандидат биологических наук



А.Ф. Орловский

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы. В 1988 году в молоке был открыт новый белок – представитель суперсемейства рибонуклеаз, названный ангиогенином (от греч. angion – сосуд) [Maes et al., 1988]. Он оказался мощным индуктором роста кровеносных сосудов. В настоящее время достаточно полно изучены структура, физико-химические и ферментативные свойства ангиогенина молока [Комолова и др. (обзор), 2002]. Однако его биологические свойства мало изучены. На основании уже имеющихся исследований можно заключить, что открытый белок полифункционален и играет важную роль в поддержании гомеостаза различных систем животного организма. В свете результатов недавних исследований есть основание рассматривать ангиогенин в качестве одного из значимых факторов пассивного иммунитета, передаваемого с молоком от матери к потомству. Исследования его функций делают только первые шаги, и в этой области следует ожидать значимых для практического использования (медицина, фармакология, пищевая отрасль) открытий. Настоящая работа проводилась в рамках нового перспективного направления исследований функций биологически активных белков молока и их комплексов с целью создания на их основе физиологически активных пищевых добавок, а также новых эффективных препаратов лечебного назначения.

Цель и задачи исследования:

Цель настоящей работы заключалась в изучении биологических свойств ангиогенина коровьего молока, связанных с его защитной функцией.

Поставленная цель определила задачи диссертационной работы:

1. Получить из коровьего молока высокоочищенный, биологически активный препарат ангиогенина.
2. Разработать количественный иммуноферментный метод определения ангиогенина в биологических жидкостях.

3. Исследовать способность ангиогенина проникать в кровь животных при пероральном введении.
4. Изучить антимикробное действие ангиогенина молока, используя в качестве тест-системы патогенной микрофлоры желудочно-кишечного тракта (ЖКТ) - E.Coli.
5. Исследовать влияние ангиогенина на цитокиновое звено иммунитета – значимое составляющее пускового механизма иммунного ответа.
6. Исследовать фармакокинетику ангиогенина в лимфоидных органах.

Научная новизна. Разработаны новые способы хроматографической очистки ангиогенина (АНГ) из молока и количественный иммуоферментный метод определения ангиогенина в биологических жидкостях. Установлены новые биологические свойства АНГ молока: проникновение через ЖКТ в кровь; бактериостатическое действие; иммуномодулирующее действие на уровне цитокинового звена иммунитета. На основании фармакокинетических исследований установлено проникновение АНГ через гематотимотический барьер и накопление его в тимусе.

Практическая значимость. Результаты исследования могут найти применение в рекомендации АНГ в качестве биологически активной основы в разработках препаратов парафармацевтического назначения широкого спектра действия, в частности, иммунокорректирующего, антимикробного, заживляющего, а также продуктов функционального назначения.

Апробация работы. Основные положения работы были представлены на всероссийской конференции с международным участием “Политика здорового питания в России: пробиотики и пробиотические продукты в профилактике и лечении наиболее распространенных заболеваний человека” (Москва, 1999), 3-ей международной научно-технической конференции “Пища. Экология. Человек.” (Москва, 1999), школе-конференции молодых ученых “Горизонты физико-химической биологии” (Пушино, 2000), международной научно-технической конференции “Живые системы и биологическая безопасность населения” (Моск-

ва, 2002) и 7-ой школе-конференции молодых ученых “Биология – наука XXI века” (Пушино, 2003).

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 15 печатных работ, в том числе десять статей и один патент.

Объем работы. Диссертационная работа состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов исследования, изложения результатов и их обсуждения (6 глав), выводов, списка цитируемой литературы и приложения. Работа изложена на 130 страницах, включает 26 рисунков и 9 таблиц. Список цитируемой литературы включает 188 наименований, в том числе 146 на иностранных языках.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объекты исследования. В экспериментах *in vivo* использовали мышей линии BALB/с и крыс породы Вистар. Для получения антител к ангиогенину проводили иммунизацию кроликов (самцов) породы Шиншилла. Оценку содержания ангиогенина проводили в свежесвыдоенном молоке коров черно-пестрой породы одной популяции в первой половине лактации; в сборном молоке, поступающем на переработку на молочные заводы; во вторичном молочном сырье. Изучение влияния ангиогенина на бактерии группы кишечной палочки проводили на *Escherichia coli* штамм В-125, полученный из коллекции Государственного института селекционного контроля им. Л. А. Тарасевича. Влияние ангиогенина на продукцию интерлейкинов исследовали на лейкоцитах человека, выделенных центрифугированием донорской крови в градиенте фиколл-верографина по общепринятому методу.

Препаративные методы. Выделение ангиогенина из цельного коровьего молока проводили с использованием ионообменной (КМ-целлюлоза 52, CM-Toyopearl 650 S) и гидрофобной (Butyl-Toyopearl 650 S) хроматографии. О чистоте выделенного ангиогенина судили на основании электрофоретических исследо-

ваний (белковый SDS-электрофорез в 15%-ом ПААГ). Выделение из печени крыс рибосомной РНК проводили методом фенольной экстракции.

Аналитические методы. Рибонуклеазную активность панкреатической РНКазы А и ангиогенина определяли спектрофотометрическим методом, с использованием в качестве субстратов: тотальной дрожжевой РНК, транспортной РНК, поли U.

Для изучения ферментативной активности ангиогенина против рибосомной 28S и 18S РНК проводили электрофорез в 1,1% агарозном геле, содержащем 6% формальдегид.

Содержание ангиогенина в исследуемых образцах определяли методом ИФА и методом, основанным на реакции конкурентного взаимодействия ангиогенина и пРНКазы с плацентарным ингибитором РНКазы.

Количество продуцируемых лейкоцитами цитокинов определяли иммуноферментным методом на основе моноклональных антител с применением в качестве индикаторного фермента пероксидазы хрена согласно руководству, прилагаемому к набору реагентов для определения интерлейкинов фирмой ООО "Протеиновый контур" (Россия).

Ангиогенную активность очищенного препарата АНГ определяли методом кожной пробы и методом микрокармана в роговице глаза крыс.

Антимикробное действие ангиогенина молока исследовали путем посева на чашки Петри со средой Эндо по методу Дригальского, с последующим подсчетом числа выросших колоний.

Кристаллическую структуру белков крови изучали с использованием методик клиновидной дегидратации (закрывтая капля) с последующим поляризационно-оптическим изучением препарата в скрещенных поляризаторах.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

1. Очистка ангиогенина из коровьего молока и его идентификация.

Для исследования функциональных свойств ангиогенина молока необходимо иметь в достаточных количествах интактный высоко очищенный препарат ангиогенина. В связи с этим нами был разработан достаточно простой эффективный метод очистки ангиогенина из молочного сырья с использованием хроматографии (катионообменной и гидрофобной) низкого давления.

На первом этапе - на колонке с КМ-целлюлозой 52 получали фракцию катионных белков, обогащенную сильно основным белком - ангиогенином (изоэлектрическая точка выше 10,5). После диализа белок наносили на колонку с CM-Toyopearl 650S. Элюцию проводили повышающимся градиентом концентрации KCl (Рис. 1). На этой стадии удавалось эффективно очистить препарат от большинства балластных белков, однако препарат был значительно загрязнен панкреатической РНКазой А - ферментом, гомологичным по структуре ангиогенину и присутствующем в молоке в сравнительно высокой концентрации (до 30 мг/л) [Шидловская, 1985]. Для очистки от РНКазы А была использована гидрофобная хроматография на колонке с Butyl-Toyopearl 650S. Белки элюировали понижающимся градиентом концентрации сульфата аммония. Как следует из хроматограммы на рисунке 2, ангиогенин выходил с колонки четким симметричным пиком. Обладающие ангиогенной активностью фракции не содержали РНКазу А, которая выходила с колонки отдельным пиком.

Как следует из данных, приведенных в таблице 1, в результате трех этапов очистки был получен гомогенный, по данным электрофореза в ПААГ (Рис. 3), препарат ангиогенина с выходом 49% и степенью очистки в 12000 раз.

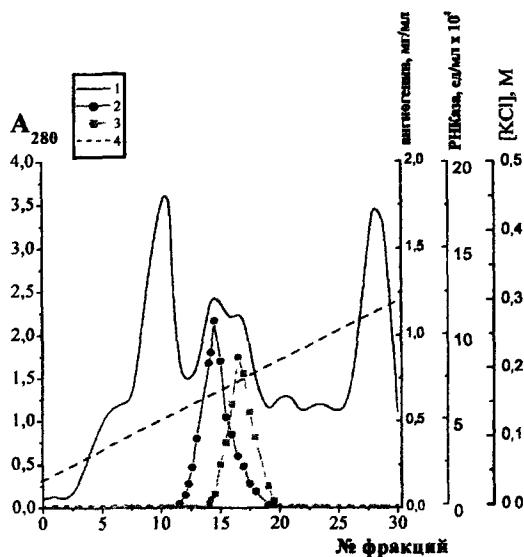


Рис. 1. Профиль элюции ангиогенина с CM-Toyopearl 650 S.

1 – оптическая плотность A при 280 нм,
 2 – концентрация ангиогенина,
 3 – активность РНКазы А,
 4 – концентрация KCl.

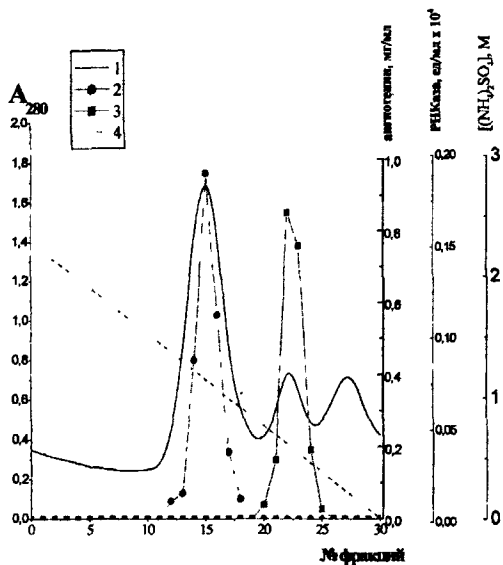


Рис. 2. Профиль элюции ангиогенина с Butyl-Toyopearl 650 S.

1 – оптическая плотность A при 280 нм,
 2 – концентрация ангиогенина,
 3 – активность РНКазы А,
 4 – концентрация KCl.

Таблица 1. Хроматографическая очистка ангиогенина из коровьего молока.

Этап очистки	Объем, мл	Белок, мг	АНГ, мг	Выход, %	Степень очистки, n
Обезжиренное молоко	4000	1.4×10^5	12.0	100	1
КМ-целлюлоза 52	45	83.0	9.0	75	1300
СМ-Toyopearl 650S	9	11.0	7.1	59	7500
Butyl-Toyopearl 650S	9	5.7	5.9	49	12000

* - Для определения концентрации ангиогенина использовали реакцию конкурентного взаимодействия АНГ и пРНКаза с плацентарным ингибитором РНКазы [Ионова, 1998].

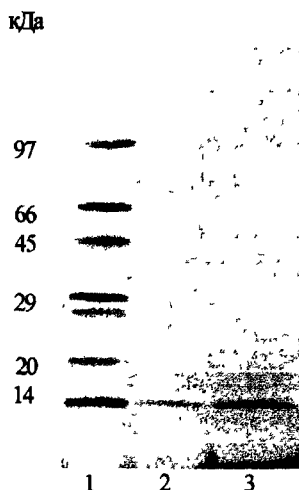


Рис. 3. Электрофорез ангиогенина в ПААГ в присутствии додецилсульфата натрия: 1 - маркерные белки, 2 - ангиогенин из коровьего молока, 3 - рекомбинантный ангиогенин человека.

Выделенный белок обладал характерной для ангиогенинов низкой рибонуклеазной активностью против тРНК и в то же время был практически неактивен относительно таких стандартных для панкреатических РНКаз субстратов как поли-U и тотальная дрожжевая РНК, но проявлял специфическую для ангиогенинов

активность относительно 28S и 18S рРНК из печени крыс (Рис. 4). Все указанные ферментативные свойства исследуемого белка присущи ангиогенину.

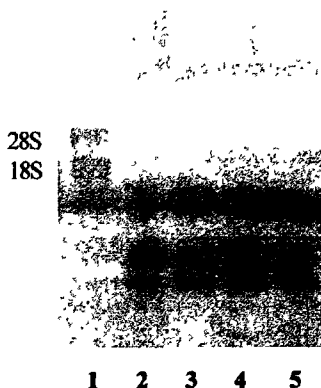


Рис. 4. Результаты гидролиза 28S и 18S рРНК ангиогенином.

рРНК (20 мкг) инкубировали в отсутствие и присутствии ангиогенина при 37° С в течение 30 минут.

1 – рРНК без ангиогенина, 2-5 – концентрация ангиогенина 20, 40, 60, 80 мкг/мл соответственно.

Однако для окончательной идентификации очищенного белка существенно было его проанализировать на ангиогенную активность – свойство, присущее всем известным ангиогенинам. Исследование показало, что выделенный препарат обладает ангиогенной активностью, что было установлено как по кожному тесту, так и по индукции васкуляризации на роговице глаза крыс. Через 7 суток после внутрикожной инъекции 5 мкг исследуемого белка в составе низкоплавкой агарозы на внутренней стороне отпрепарированного участка кожи крыс в районе имплантата появлялось большое количество хорошо различимых под микроскопом (12-кратное увеличение) вновь сформированных кровеносных сосудов (Рис. 5). В контрольных образцах (агарозный имплантат не содержал белка или содержал панкреатическую рибонуклеазу А в той же концентрации, что и исследуемый белок) заметной индукции васкуляризации не наблюдалось. При имплантации в роговицу глаза крыс импрегнированной анализируемым белком "таблетки" из метилцеллюлозы через 5 суток наблюдалось образование новых капилляров, растущих от кровеносных сосудов каймы глаза к имплантату (Рис. 5).

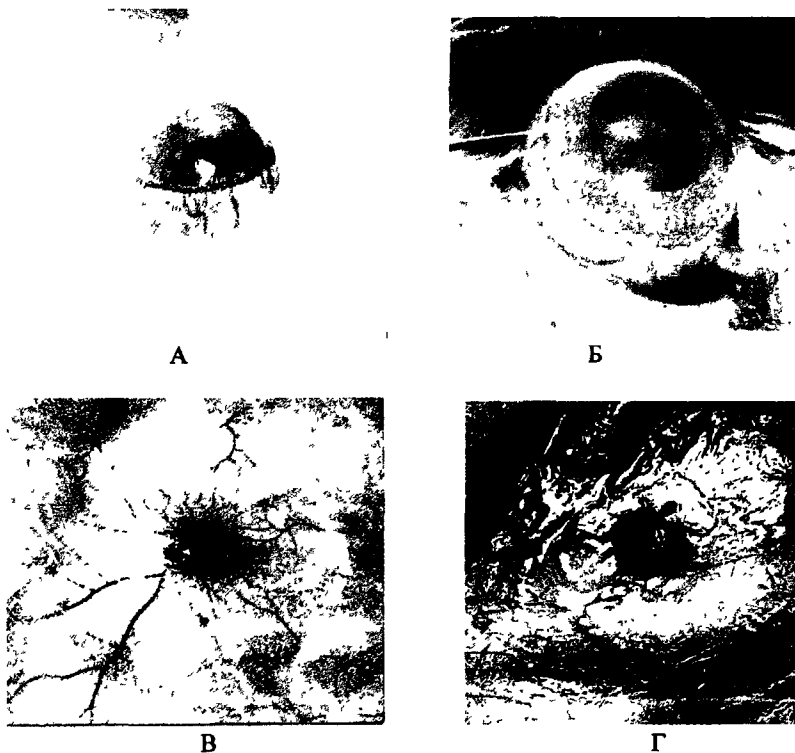


Рис. 5. Индуцированная ангиогенином неоваскуляризация: в роговице глаза крыс (А-ангиогенин, Б-контроль), в коже крыс (В-ангиогенин, Г-контроль).

Таким образом, на основании полученных данных относительно молекулярной массы, субстратной специфичности, особенностей ферментативного гидролиза 28S и 18S рРНК и ангиогенной активности можно заключить, что выделенный из коровьего молока описанным способом белок обладает основными, характерными для семейства ангиогенинов признаками.

2. Иммуноферментный анализ ангиогенина.

Для количественного определения АНГ из коровьего молока был адаптирован конкурентный вариант твердофазного иммуноферментного анализа (ИФА).

Очищенный ангиогенин использовали для получения поликлональных кроличьих антител. Максимальный иммунный ответ при стандартной схеме иммунизации появлялся на 37 день после первичной иммунизации и детектировался до 66 дня методом радиальной иммунодиффузии по Ухтерлони. Аналогичные данные были получены при определении титра антисыворотки методом непрямого твердофазного иммуноанализа. Титр составил 1:12800 для стандартной схемы иммунизации.

Модифицированным периодатным методом [Карулин А.Ю. и др., 1989] получали конъюгат поликлональных антител с пероксидазой хрена ($AT_{анг}$ -ПХ), который использовали при проведении твердофазного иммуноферментного анализа. Как показано на рисунке 6 конъюгат может быть использован для детекции антигена в концентрации от 1 до 5 мкг/мл, используя в качестве субстрата диаммонийную соль 2,2-азино-ди(3-этил-2,3-дигидробензотиазолин-6-сульфоновой кислоты) (ABTS).

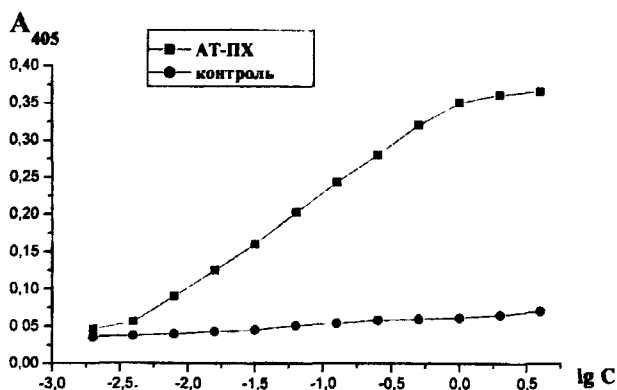


Рис. 6. Определение оптимальной концентрации (С, мкг/мл) конъюгата $AT_{анг}$ -ПХ для иммуноферментного анализа. Время инкубации с субстратом (ABTS) - 30 мин при комнатной температуре в 0.01 М натрий-цитратном буфере, pH 4.0.

По оси ординат - оптическая плотность А при 405 нм продукта пероксидазного окисления ABTS перекисью водорода.

При использовании конкурентного метода ИФА планшеты с сорбированным ангиогенином инкубировали в течение 1 ч при температуре 37°C с раствором, содержащим антиген в известных концентрациях и конъюгат пероксидазы с поликлональными антителами к ангиогенину (1 мкг/мл). Ферментативную активность, связанную с твердой фазой, определяли по ABTS спектрофотометрически на считывающем устройстве для иммуноферментного анализа "Dynatech MP600" (США). На рисунке 7 представлена типичная калибровочная кривая для определения концентрации ангиогенина методом конкурентного ИФА в биологических жидкостях. Чувствительность метода составляет 10 нг/мл.

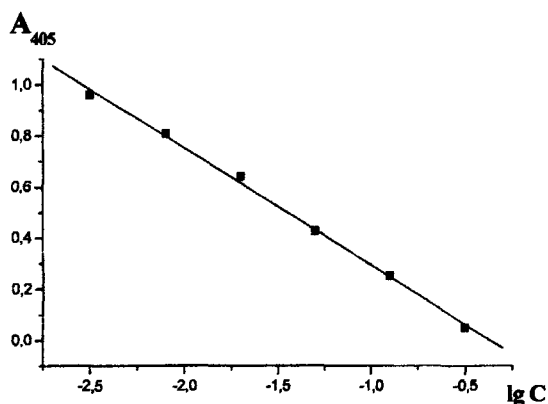


Рис. 7. Типичная калибровочная кривая для определения концентрации ангиогенина (C) методом конкурентного ИФА с использованием конъюгата АТ_{анг}-ПХ (1 мкг/мл).

По оси ординат - оптическая плотность A при 405 нм продукта пероксидазного окисления ABTS перекисью водорода.

Метод был апробирован для определения содержания ангиогенина в молоке коров в зависимости от периода лактации и физиологических факторов, а также во вторичном молочном сырье.

3. Проникновение ангиогенина в кровь животных через желудочно-кишечный тракт при пероральном введении.

Есть основание рассматривать ангиогенин молока в качестве биологически активного фактора, участвующего в механизмах передачи иммунитета через мо-

локо от матери потомству, особенно в ранний постнатальный период, когда собственные защитные механизмы в полной мере еще не сформированы. С таким представлением согласуется тот факт, что содержание ангиогенина в молоке коров зависит от стадии лактации, причем, наиболее высокий его уровень приходится на молозивный период [Ионова, 1998]. Известно, что в основном пищевые белки под влиянием пищеварительных ферментов в ЖКТ подвергаются расщеплению до аминокислот и низкомолекулярных пептидов. Однако неоспорим и тот факт, что стенка тонкой кишки, через которую происходит всасывание пищевых веществ, проницаема для определенной части нерасщепленных или слабо расщепленных белков, не утративших своих биологических свойств [Тимофеева и др., 2000]. Известно, что ангиогенин устойчив к низким значениям pH и к действию протеолитических ферментов, в том числе к протеазам желудочно-кишечного тракта. Представляло интерес исследовать проникает ли при пероральном приеме ангиогенин коровьего молока из желудочно-кишечного тракта в кровь?

Мышам линии BALB/c (самцы) различных возрастных групп вводили ангиогенин из расчета 6 мкг/г массы тела. Животные контрольных групп получали корм, не содержащий ангиогенина. Анализ АНГ в крови методом ИФА проводили до начала кормления (фоновое связывание), сразу после окончания кормления, а затем каждые 30 мин в течение трех часов. Величину фонового связывания антител к бычьему ангиогенину с белками крови мыши учитывали при расчете в анализируемых образцах концентрации экзогенного ангиогенина.

Исследования показали, что у животных контрольных групп на протяжении всего срока наблюдений не отмечается изменений в связывании белками крови конъюгатов, содержащих антитела к бычьему ангиогенину.

На рисунке 8 показана динамика изменения уровня ангиогенина в крови животных различных возрастных групп. Как видно из представленных данных, не имеется существенных различий в динамике изменения концентрации ангиогенина в крови мышей зрелого и предстарческого возраста. В тоже время наблюдается

выраженное различие в динамике процесса для животных этих групп по сравнению с первой группой (молодые мыши).

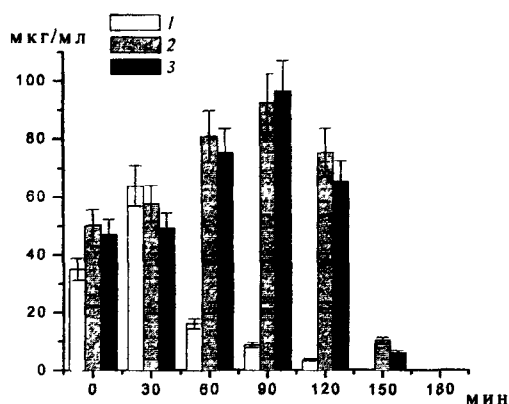


Рис. 8. Динамика изменения в крови мышей концентрации АНГ.

Ось абсцисс - время после перорального введения ангиогенина; ось ординат - концентрация ангиогенина ($M \pm m$) в крови мышей (линии BALB/c, самцов) опытных групп различного возраста:

1 - ювенильный (1,5 месяца);

2 - зрелый (10 месяцев);

3 - предстарческий (15 месяцев).

Максимальная концентрация экзогенного ангиогенина в крови мышей первой группы (63.7 ± 7.2 мкг/мл), по сравнению со второй (92.1 ± 10.3 мкг/мл) и третьей (96.2 ± 10.5 мкг/мл), ниже (различия статистически достоверны), причем, максимум достигается раньше. Очевидно перорально вводимый молодым мышам ангиогенин быстрее проникает в кровь и быстрее из нее выводится.

Таким образом, ангиогенин проникает через стенку желудочно-кишечного тракта, и этот процесс зависит от возраста животных.

4. Антимикробное действие ангиогенина молока.

Проникновение АНГ через стенку желудочно-кишечного тракта скорее всего связано с его защитной функцией. Не исключено, что ангиогенин является одним из неспецифических факторов антибактериального комплекса молока. Поскольку потомство получает АНГ с молоком матери, можно предположить его действие и непосредственно в желудочно-кишечном тракте. Представляло интерес исследование влияния АНГ на жизнеспособность патогенной микрофлоры

ЖКТ на примере бактерий группы кишечной палочки. Принятый в качестве тест-культуры серологический тип *E. coli*, штамм В-125 относится к энтеропатогенным кишечным палочкам, которые при определенных условиях (например, снижение иммунитета, неконтролируемое применение антибиотиков) способны вызывать колиэнтериты, пищевые токсикоинфекции и другие острые кишечные заболевания.

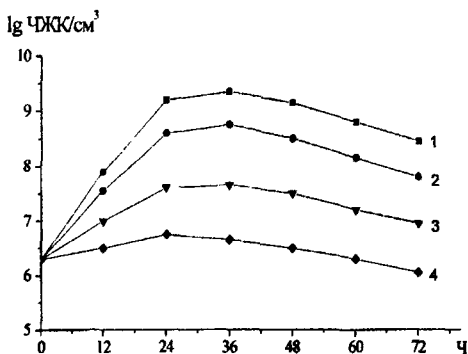


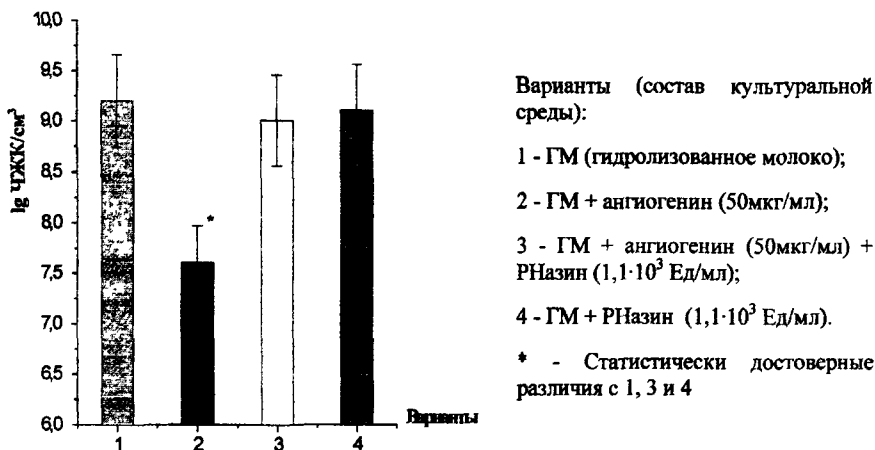
Рис. 9. Влияние ангиогенина на динамику роста *E. coli* штамм В-125 в гидролизованном молоке. ЧЖК - число жизнеспособных клеток.

1 - без ангиогенина (контроль);

2, 3, 4 - с ангиогенином в концентрации соответственно 12,5, 50 и 100 мкг/мл.

Динамика роста исследуемых бактерий в отсутствии и при разных дозах ангиогенина в культуральной среде показана на рисунке 9. В контрольных образцах логарифмическая фаза роста пролонгируется приблизительно до 24 часов. При введении в культуральную среду ангиогенина в дозе, приближенной к его естественному максимальному содержанию в молоке, через сутки культивирования отмечалось снижение количества клеток тест-культуры. Ингибирующий эффект имел место на протяжении всего периода культивирования и зависел от дозы ангиогенина. Так, при концентрации ангиогенина 12,5 мкг/мл число жизнеспособных клеток снижалось приблизительно в 3-5 раз, а при увеличении дозы в 4 раза - почти на два порядка. При концентрации 100 мкг/мл рост тест-культуры был незначителен. Следует отметить, что в пределах интервала исследуемых концентраций ангиогенина дозовая зависимость его действия на тест-культуру не являлась прямопропорциональной.

Рис. 10. Снятие бактериостатического эффекта ангиогенина из молока РНазинном (М±m). ЧЖК - число жизнеспособных клеток.



Известно, что ангиогенин образует с плацентарным ингибитором РНКазы стойкий комплекс с потерей ферментативной активности. Из данных, представленных на диаграмме (Рис. 10) следует, что сам ингибитор на рост тест-культуры не влияет, но снимает бактериостатический эффект ангиогенина. В образцах, содержащих ангиогенин в концентрации 50 мкг/мл через 24 часа культивирования, по сравнению с интактным контролем, число клеток *E. Coli* было снижено. Однако если в опытные образцы дополнительно вносили ингибитор, то бактериостатическое действие ангиогенина не проявлялось. Вероятно, ферментативная активность ангиогенина играет определенную роль в антагонистическом его действии на исследуемые бактерии.

Таким образом, ангиогенин, очищенный из коровьего молока, обладает бактериостатическим действием относительно *E. Coli* (штамм В-125). Эффект проявляется уже при дозах, соответствующих концентрации ангиогенина в молозиве и повышается с увеличением дозы.

5. Влияние ангиогенина на репродукцию лейкоцитами крови иммунных цитокинов.

Учитывая высокую чувствительность цитокиновой системы к защитным белкам молока, в качестве теста на иммуномодулирующее влияние ангиогенина, также входящего в "защитный комплекс" молока, была выбрана репродукция вторичных иммунных мессенджеров клетками иммунной системы (лейкоцитами) в отсутствии и присутствии известного индуктора - фитогемагглютенина (ФГА). Было изучено влияние АНГ на продукцию интерлейкина-1 β (ИЛ-1 β), интерлейкина-6 (ИЛ-6) и фактора некроза опухолей- α (ФНО α) - цитокинов, функционально связанных между собой, и играющих важнейшую роль в первой линии защиты организма при иммунном ответе.

Из полученных данных следует, что АНГ способен индуцировать в лейкоцитах продукцию всех исследованных цитокинов. Уровень продуцируемых цитокинов зависит от концентрации ангиогенина и времени, прошедшего после начала его контакта с лейкоцитами.

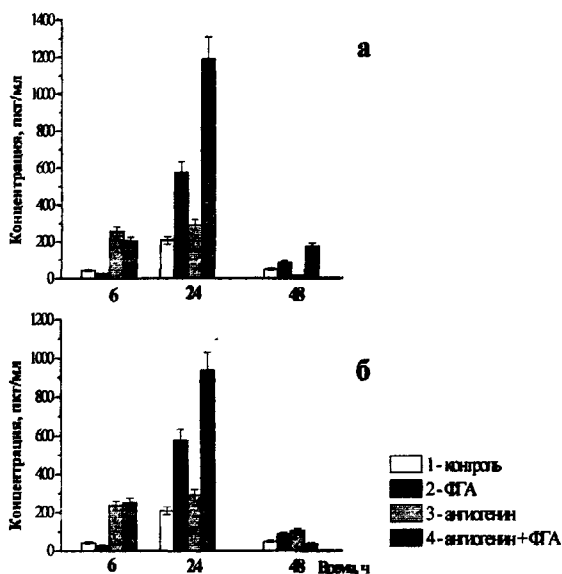


Рис. 11. Продукция ИЛ-1 β лейкоцитами крови человека после индукции ангиогенином и фитогемагглютенином (ФГА).

АНГ: а - 50 мкг/мл,
 б - 200 мкг/мл,
 ФГА - 15 мкг/мл.

С целью изучения влияния ангиогенина на способность лейкоцитов продуцировать цитокины при одновременном действии с ФГА, в культуральную среду лейкоцитов вводили препараты в концентрациях – ФГА (15 мкг/мл), АНГ (50 и 200 мкг/мл). Как следует из данных, представленных на рисунке 11, через 6 часов после контакта с ангиогенином (независимо от его дозы) активация продукции ИЛ-1 β в равной мере проявлялась как для активированных, так и неактивированных ФГА лейкоцитов. Однако через 24 часа проявлялся синергический эффект при двойной индукции (ФГА+АНГ). Через 48 часов влияние контакта с индукторами проявлялось незначительно как при раздельном, так и совместном действии.

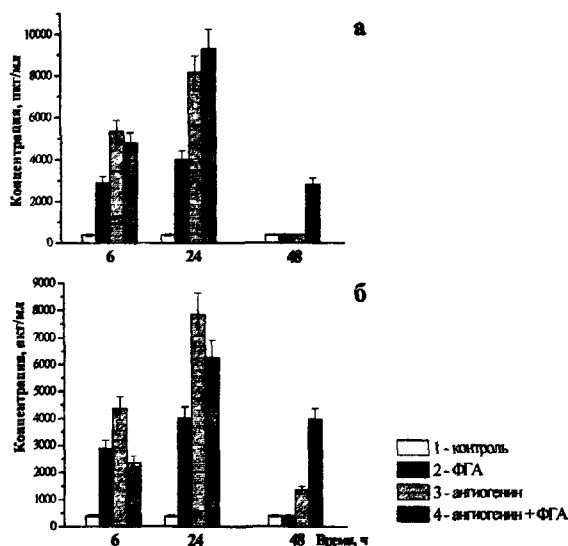


Рис. 12. Продукция ИЛ-6 лейкоцитами крови человека после индукции ангиогенином и фитогемагглютинином (ФГА).

АНГ: а - 50 мкг/мл,
 б - 200 мкг/мл,
 ФГА - 15 мкг/мл.

Как следует из данных, представленных на рисунке 12, при использованных дозах ангиогенин является более сильным индуктором в отношении продукции ИЛ-6, чем ИЛ-1 β . Как через 6 часов, так и через 24 часа после контакта с лейкоцитами, АНГ (в обеих дозах) оказался также более активным индуктором, чем ФГА. При их совместном действии по сравнению с действием одного АНГ не происходило статистически достоверного изменения уровня продуцируемого ИЛ-

6. Через 48 часов еще сохранялся эффект АНГ (при дозе 200 мкг/мл). При двойной индукции эффект усиливался.

Установленный факт способности ангиогенина индуцировать в лейкоцитах крови человека продукцию цитокинов (ИЛ-1 β , ИЛ-6, ФНО α) позволяет предположить участие ангиогенина в механизмах функционирования иммунной системы на уровне цитокинового звена.

6. Характеристика распределения и элиминации ангиогенина молока в головном мозге и иммунокомпетентных органах животных.

Иммуномодулирующие свойства ангиогенина [Елисеева и Мертвецов, 1993, 1997] могут реализоваться, очевидно, не только непосредственно через иммунокомпетентные клетки крови [Matousek et al., 1995], но и их предшественники в лимфоидных органах. Другая важная для этих процессов мишень – головной мозг, так как иммунитет находится под контролем центральной нервной системы. В связи с этим была исследована фармакокинетика вводимого внутривенно животным ангиогенина с учетом распределения в головном мозге, тимусе и костном мозге. Оценка параметров фармакокинетической модели ангиогенина после введения проводили с помощью стандартной однокамерной кинетической модели [Каркищенко и др., 2001].

Полученные результаты свидетельствуют о высокой скорости оборота ангиогенина в животном организме, что согласуется с литературными данными по фармакокинетике рекомбинантного ангиогенина [Vasandani et al., 1996]. Уже в первые минуты после инъекции отмечается быстрое падение содержания препарата в сыворотке крови (Рис. 13). Через пять минут снижение составляет около 50%. Достоверное содержание препарата в крови отмечается приблизительно до 90 минут от начала его введения. Уровень ангиогенина в крови в данный момент времени зависит, в случае непосредственного введения его в кровь, в основном от

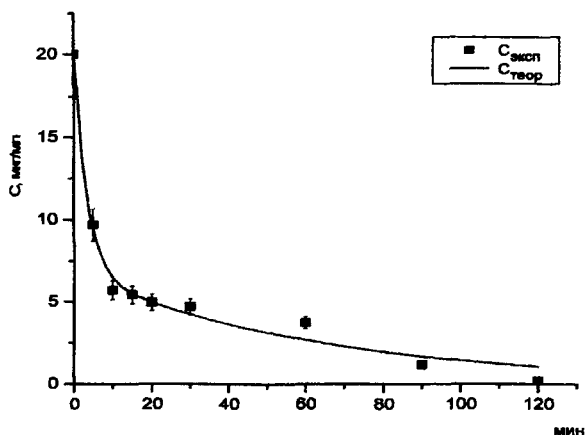


Рис. 13. Изменение концентрации ангиогенина в сыворотке крови мышей. Ось абсцисс - время после инъекции (мин); ось ординат - концентрация ангиогенина (C, мкг/мл).

двух факторов -- элиминации и распределения по органам. Согласно полученным значениям фармакокинетических параметров (Табл. 2), в рассматриваемом случае элиминация не столь значима, как распределение, так как величина общего клиренса, отражающего способность организма к элиминации, довольно низкая.

Таблица 2. Основные фармакокинетические параметры ангиогенина для сыворотки крови.

$t_{1/2}$, мин	C_0 , мкг/мл	V_d , мл/г	K_e , мин ⁻¹	CL, мл/мин·г	AUC, мкг·мин/мл	AUMC, мкг·мин ² /мл	MRT, мин
52,90	20	0,029	0,0131	$0,38 \cdot 10^{-3}$	1526,72	$11,65 \cdot 10^4$	76,33

$t_{1/2}$ - период полувыведения; C_0 - начальная концентрация АНГ в плазме крови; V_d - кажущийся объем распределения; K_e - константа элиминации; CL - клиренс; AUC - суммарная площадь под кривой концентрации АНГ от момента его попадания в организм до полного удаления; AUMC - суммарная площадь под кривой произведения времени на концентрацию АНГ в организме от момента его попадания в организм до полного выведения из него; MRT - среднее время удержания АНГ в организме.

Была изучена динамика накопления ангиогенина в лимфоидных органах и головном мозгу мышей. Из результатов экспериментов следует, что введенный в кровь ангиогенин проникает во все исследуемые органы. Накопление препарата в них во времени проходит через максимум, нарастая с константой скорости K_a и убывая с константой скорости K_e . Для органов оценку параметров однокамерной фармакокинетической модели АНГ проводили с учетом всасывания (Табл. 3).

Таблица 3. Основные фармакокинетические параметры ангиогенина для тест-органов.

Органы	K_a , мин ⁻¹	K_e , мин ⁻¹	$t_{1/2}$, мин	Q_0 , мкг	AUC, мин	AUMC, мин ²	MRT, мин
Костный мозг	0.084	0.020	34.65	0.93	46.5	2325	50
Тимус	0.153	0.015	46.20	8.87	591.3	39422	67
Головной мозг	0.042	0,090	7.70	24.27	269.6	2996	11

K_a – константа всасывания; K_e – константа элиминации; $t_{1/2}$ – период полувыведения; Q_0 – предел накопления АНГ в органе при заданном значении дозы; AUC – суммарная площадь под кривой концентрации АНГ от момента его попадания в орган до полного удаления; AUMC – суммарная площадь под кривой произведения времени на концентрацию АНГ в органе от момента его попадания в орган до полного выведения из него; MRT – среднее время удержания АНГ в органе.

Повышение содержания ангиогенина в исследованных органах в начальный период после инъекции происходит одновременно с наиболее выраженным падением его содержания в сыворотке крови, но при этом отмечается определенная избирательность распределения. В частности, в костный мозг распределяется наименьшее количество ангиогенина, достигая максимума к 20 минутам, а в головной мозг – наибольшее. При этом максимум достигается к 15 минутам, но белок быстро выводится. В этом случае константа элиминации приблизительно в 2 раза больше, чем константа всасывания. Как следствие, время удерживания составляет всего 11 минут против 50 и 67 минут в костном мозге и тимусе соответственно. Это объясняется тем, что в тимусе и костном мозге константы элимина-

ции меньше, чем константы всасывания (на порядок для тимуса и в ~ 4 раза для костного мозга).

Таким образом, ангиогенин дольше всего удерживается в тимусе и медленнее всего из него выводится, что может свидетельствовать о преодолении им гематотимотического барьера и определять более длительный его контакт с предшественниками тимус-зависимых иммунокомпетентных клеток. Можно полагать, что *in vivo* накопление в тимусе ангиогенина функционально связано с его иммуномодулирующим действием.

ВЫВОДЫ

1. С использованием катионообменной и гидрофобной хроматографии низкого давления разработан способ получения из коровьего молока электрофоретически чистого нативного препарата ангиогенина (выход 49%, степень очистки 12000 раз).
2. Конкурентный метод иммуноферментного анализа на основе конъюгата поликлональных антител к ангиогенину с пероксидазой хрена адаптирован для количественного определения бычьего ангиогенина в биологических жидкостях. Чувствительность метода составляет 10 нг/мл.
3. Впервые обнаружена способность ангиогенина или его фрагментов при пероральном введении проникать в кровь через желудочно-кишечный тракт.
4. Установлено, что ангиогенин обладает бактериостатическим действием относительно условно патогенного штамма *E. Coli*. Дозозависимый эффект ангиогенина проявляется уже при значениях концентрации его в культуральной среде, соответствующих физиологическим.
5. Показано, что ангиогенин является индуктором продукции лейкоцитами человека провоспалительных интерлейкинов (ИЛ-1 β , ИЛ-6, ФНО α) – значимых посредников в механизмах развития иммунного процесса на уровне цитокинового звена.

6. На основании фармакокинетических исследований установлена высокая скорость обмена инъецированного животным ангиогенина в головном мозге, костном мозге и тимусе.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (грант № 00-04-48067).

Список работ, опубликованных по материалам диссертации:

1. Шалыгина А.М., Тихомирова Н.А., Рустамьян Ю.Л., Комолова Г.С. "Новый белок молока ангиогенин" // Научно-технич. сборник АГРОНИИТЭИ ММП. 1995. В. 1. С. 14-15.
2. Шалыгина А.М., Тихомирова Н.А., Рустамьян Ю.Л., Комолова Г.С. "Выделение ангиогенина из молочного сырья" // Молочная промышленность. 1995. № 4. С. 22-23.
3. Рогов И.А., Шалыгина А.М., Тихомирова Н.А., Рустамьян Ю.Л., Скоробогатько О.В., Михайлов А.М., Степанова Е.В., Комолова Г.С. "Количественное определение ангиогенина быка" // Биохимия. 1995. Т. 60. В. 8. С. 1344-1348.
4. Рогов И.А., Михайлов А.М., Шалыгина А.М., Тихомирова Н.А., Рустамьян Ю.Л., Комолова Г.С. "Очистка ангиогенина из коровьего молока" // Прикл. биохимия и микробиология. 1997. Т. 33. № 1. С. 107-110.
5. Рустамьян Ю.Л., Шалыгина А.М., Тихомирова Н.А., Рабинович М.Л., Плешанов А.Н., Комолова Г.С. "Имуноферментный анализ ангиогенина в молоке коров" // Прикл. биохимия и микробиология. 1999. Т. 35. № 1. С. 105-108.
6. Тихомирова Н.А., Шалыгина А.М., Ганина В.И., Алякина Е.А., Комолова Г.С., Рустамьян Ю.Л. "Влияние катионной фракции белков молока на бактерии группы кишечной палочки" // Молочная промышленность. 1999. № 11. С. 31-33.

7. Рогов И.А., Шалыгина А.М., Комолова Г.С., Рустамьян Ю.Л., Тихомирова Н.А., ИONOва И.И. “Способ количественного определения ангиогенина в молочном сырье” Патент № 2133464, 1999.
8. Рустамьян Ю.Л., Тихомирова Н.А., Комолова Г.С. “Использование иммуноферментного анализа ангиогенина для разработки диетических молочных продуктов” // “Политика здорового питания в России: пробиотики и пробиотические продукты в профилактике и лечении наиболее распространенных заболеваний человека” Материалы Всероссийской конференции с международным участием. Москва. 1999. С.43.
9. Рустамьян Ю.Л., Комолова Г.С., Тихомирова Н.А., Шалыгина А.М. “Анализ содержания ангиогенина в молоке коров черно-пестрой породы” // “Пища. Экология. Человек.” Материалы 3-ей Международной научно-технической конференции. Москва. 1999. С. 33.
10. Рустамьян Ю.Л., Комолова Г.С. “Определение ангиогенина в молоке коров” // “Горизонты физико-химической биологии” Материалы школы-конференции молодых ученых. Пушино. 2000. Т. 1. С. 152.
11. Рустамьян Ю.Л., Комолова Г.С. “Проникновение в кровь мышей вводимого перорально ангиогенина из коровьего молока” // Известия АН. Серия биологическая. 2002. № 2. С. 224-227.
12. Тихомирова Н.А., Шалыгина А.М., Ганина В.И., Алякина Е.А., Рустамьян Ю.Л., Комолова Г.С. “Влияние ангиогенина коровьего молока на бактерии группы кишечной палочки” // Иммунология. 2002. Т. 23. № 2. С. 105-106.
13. Рогов И.А., Тихомирова Н.А., ИONOва И.И., Федорова Т.В., Рустамьян Ю.Л., Комолова Г.С. “Изучение БАД парафармацевтического действия на основе ангиогенина” // “Живые системы и биологическая безопасность населения” Материалы Международной научно-технической конференции. Москва. МГУ ПБ. 2002. С. 119.

14. Щегловитова О.Н., Максянина Е.В., Ионова И.И., Рустамьян Ю.Л., Комолова Г.С. "Ангиогенин молока коров индуцирует в лейкоцитах крови человека продукцию цитокинов" // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 2003. Т. 135. № 2. С. 182-185.

15. Плаксина Г.В., Комолова Г.С., Машков А.Е., Рустамьян Ю.Л., Пыхтеев Д.А. "Стабилизирующий эффект ангиогенина из молока на кристаллическую структуру биологических жидкостей" // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 2003. Т. 136. № 10. С. 406-409.

Напечатано с готового оригинал-макета

Издательство ООО "МАКС Пресс"

Лицензия ИД N 00510 от 01.12.99 г.

Подписано к печати 19.09.2005 г.

Формат 60х90 1/16. Усл.печ.л. 1,5. Тираж 100 экз. Заказ 553.

Тел. 939-3890. Тел./Факс 939-3891.

119992, ГСП-2, Москва, Ленинские горы, МГУ им. М.В. Ломоносова,
2-й учебный корпус, 627 к.

№ 165 24

РНБ Русский фонд

2006-4

12397