

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

УДК 547.466:547.96:612.017.1:612.112.94

Степанов А.В., Цепелев В.Л., Цепелев С.Л., Цыбиков Н.Н., Бямбаа А.

ПЕРСПЕКТИВЫ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ НОВОГО РЕГУЛЯТОРА ГУМОРАЛЬНОГО ИММУНИТЕТА В ОНКОЛОГИИ

*ГБОУ ВПО Читинская государственная медицинская академия
Университет медицинских наук Монголии*

Из ткани бурсы Фабрициуса выделен и синтезирован биологически активный пептид-Trp-Thr-Ala-Glu-Glu-Lys-Gln-Leu. Установлено, что пептид стимулирует экспрессию дифференцировочных антигенов T-, B-лимфоцитов и NK-клеток у онкологических больных. Обнаружена высокая иммуностимулирующая активность синтетического пептида при экспериментальном иммунодефиците у мышей, вызванном введением цитостатика циклофосфамида. Предполагается, что пептид может служить основой для разработки нового иммуноактивного лекарственного препарата для лечения широкого спектра иммунодефицитных состояний.

Ключевые слова: пептид, лимфоциты, иммуностимуляция.

Stepanov A.V., Tsepelev V.L., Tsepelev S.L., Tsibikov N.N., Byambaa A.
**PESPEKTIVA OF USE OF THE NEW REGULATOR OF HUMORAL I
MMUNITY IN ONCOLOGY**

Chita State Medical Academy, Health Sciences University of Mongolia

Biologically active peptide was isolated from tissue of avian bursa of Fabricius and synthesised: Trp-Thr-Ala-Glu-Glu-Lys-Gln-Leu. It is established that the peptide stimulates an expression of differentiation on T-, B-lymphocytes and NK-cells at oncological patients. High immunity stimulating activity of synthetic peptide was discovered by experimental immunodeficiency of cyclophosphamide-treated mice. There is ground to believe that peptide can form a basis for the development of new immunoregulatory remedie for treatment of a wide spectrum of immunodeficient states.

Key words: peptide, lymphocytes, immunostimulation.

Значительные успехи в лечении злокачественных новообразований достигнуты благодаря применению облучения и интенсивных схем химиотерапии. Однако подобное лечение агрессивно и вызывает иммунологическую недостаточность у пациентов. В настоящее время для снижения иммунодефицита и повышения противоопухолевой резистентности применяют методы биотерапии, влияющие на иммунную систему и поддерживающие иммунитет онкологического больного на должном уровне без стимуляции пролиферации опухолевого клона.

Поиск средств избирательного воздействия на отдельные этапы развития иммунного ответа, а также на отдельные субпо-

пуляции клеток иммунной системы является одним из ведущих направлений экспериментальной и клинической иммунологии [4, 7]. Наиболее перспективный подход к решению данной проблемы - создание иммуностимуляторов на основе эндогенных биологически активных веществ пептидной природы [2].

Важную роль в качестве продуцентов иммуноактивных пептидов играют центральные органы иммунной системы. Достаточно хорошо изучены пептиды тимуса [1, 5] и костного мозга [6]. Значительно меньше данных, касающихся пептидных регуляторов из сумки Фабрициуса - центрального органа гуморального иммунитета птиц, аналог которого у человека не иден-

тифицирован. Известно, что экстракты бursы Фабрициуса обладают иммунорегуляторными свойствами [7]. В последние годы за рубежом появляется много работ, связанных с выделением и синтезом различных активных пептидов из сумки Фабрициуса [8, 9, 10].

Цель исследования: изучение иммунологической активности пептида, выделенного нами из экстракта бursы Фабрициуса в онкологии.

Материал и методы исследования. Пептиды из ткани бursы Фабрициуса цыплят выделяли оригинальной методикой, включающей уксуснокислую экстракцию с последующим фракционированием с помощью гель-фильтрации и обращенно-фазной ВЭЖХ. На каждом этапе полученные фракции тестировали на наличие иммуностимулирующей активности. Дальнейшая работа велась только с наиболее активными фракциями. В результате последовательного разделения иммуноактивных фракций экстракта бursы Фабрициуса, нами был выделен пептид, обладающий по результатам скрининговых исследований иммуностимулирующей активностью, и установлена на газофазном секвенаторе (Model 477A, Applied Biosystems) его первичная структура - Trp-Thr-Ala-Glu-Glu-Lys-Gln-Leu. Расширенное исследование иммунологической активности пептида проводили на его синтетическом аналоге [7].

Исследования проведены на крови 18 больных раком шейки и тела матки после проведенной предоперационной лучевой терапии, операции и последующей химиотерапии. Лимфоциты у этих больных выделяли на градиенте плотности фиколл-верографин ($\rho = 1,077 \text{ г/см}^3$) и использовали в концентрации 2,5 млн. клеток/мл. Пептид вносили в культуру лимфоцитов в концентрации 5 пмоль/мл и инкубировали в течение двух часов при 37°C . В качестве контроля использовали физиологический раствор. Экспрессию дифференцировочных антигенов лимфоцитов определяли методом непрямой мембранной иммуофлюоресценции с моноклональными антителами ("Сорбент", Москва; "Sigma", США) [3]. Флюоресценцию регистрировали с помо-

щью люминесцентного микроскопа ЕС Люам-РПО11. Просматривали не менее 200 лимфоцитов. Флюоресцентная микроскопия мембранных маркеров сопровождалась морфологическим контролем клеток в фазовом контрасте.

Исследования проведены на 72 беспородных мышax-самцах массой 18-20 г. Все исследования выполнены в соответствии с "Международными рекомендациями по проведению медико-биологических исследований с использованием животных", Хельсинкской декларацией Всемирной Медицинской Ассоциации (2000). Циклофосфамид вводили в максимально переносимой дозе - 200 мг/кг однократно, внутрибрюшинно. На следующий (1 группа) или на десятый день (2 группа животных) после введения циклофосфамида мышей иммунизировали корпускулярным тимусзависимым антигеном - эритроцитами барана (ЭБ) внутрибрюшинно в дозе 7×10^9 клеток/кг однократно. Животным вводили пептид в дозе 5 нмоль/кг в 1, 2, 3 и 4 дни после иммунизации. В контрольной группе использовали инъекции физиологического раствора. На пятый день иммунного ответа у мышей контрольной и опытных групп определяли количество антителообразующих клеток (АОК) в селезенке методом локального гемолиза в геле, титр гемагглютининов [7], а также число лейкоцитов периферической крови.

Полученные данные обработаны с помощью пакета статистических программ Statistica, версия 6,0, пакета программ Biostat и Microsoft Excel 2003. При сравнении показателей исследуемых групп использовались методы непараметрической статистики, в связи с ненормальным распределением значений в вариационных рядах. Числовые данные представлены в виде медианы (Me) и интерквартильного интервала с указанием значения статистической значимости (p). Различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

Результаты исследования и их обсуждение. Известно, что лимфоциты несут на своей мембране маркеры CD, способные выполнять функцию рецепторов, сигналь-

ных или адгезивных молекул. Способность веществ усиливать или ослаблять экспрессию кластеров дифференцировки лимфоцитов и, тем самым, модулировать их функцию отражает иммуотропную активность препаратов. Нами исследовано влияние пептида на экспрессию поверхностных маркеров лимфоцитов онкологических больных.

Таблица 1

Влияние пептида на экспрессию дифференцировочных антигенов лимфоцитов у онкологических больных (в %), Me (25-75 процентиль).

Изучаемые кластеры дифференцировки	Лимфоциты здоровых доноров (контроль 1) (n=20)	Лимфоциты больных	
		Физ.раствор (контроль 2) (n = 18)	Пептид (опыт) (n = 18)
CD2	81,6 (75,2-85,4)	59,5 (53,8-64,2) $p_1 < 0,001$	80,4 (77,1-84,9) $p_2 < 0,001$
CD3	70,9 (65,9-74,3)	45,7 (39,8-49,6) $p_1 < 0,001$	68,3 (63,7-71,4) $p_2 < 0,001$
CD4	39,6 (36,2-43,4)	12,4 (9,8-16,2) $p_1 < 0,01$	31,3 (26,3-35,7) $p_2 < 0,001$
CD8	25,1 (22,3-29,7)	18,6 (15,8-20,4) $p_1 < 0,01$	19,5 (17,7-21,3) $p_2 > 0,4$
CD16	13,8 (11,9-15,6)	9,2 (7,4-11,1) $p_1 < 0,05$	13,3 (11,8-14,6) $p_2 < 0,05$
CD25	7,9 (6,7-8,9)	3,2 (2,8-3,5) $p_1 < 0,01$	8,2 (6,9-9,0) $p_2 < 0,001$
CD19	9,5 (7,8-10,7)	5,8 (4,9-6,5) $p_1 < 0,01$	6,1 (4,8-6,7) $p_2 > 0,05$
CD21	8,9 (8,1-9,5)	4,6 (4,1-5,2) $p_1 < 0,001$	8,4 (7,6-9,2) $p_2 < 0,001$
CD22	9,9 (9,1-10,8)	5,2 (4,7-5,9) $p_1 < 0,01$	7,4 (6,9-7,8) $p_2 < 0,05$
CD23	5,8 (5,3-6,2)	3,1 (2,8-3,5) $p_1 < 0,01$	6,2 (5,6-6,8) $p_2 < 0,001$
CD72	7,3 (6,5-8,0)	5,1 (4,6-5,8) $p_1 < 0,05$	5,9 (5,1-6,6) $p_2 > 0,05$

Примечание: (статистическая значимость различий): p_1 - между контролем 1 и 2, p_2 - между контролем 2 и опытом.

У онкологических больных, и особенно после лучевой и химиотерапии, снижается количество лимфоцитов, несущих на своей поверхности все изучаемые кластеры дифференцировки, особенно антигены CD3 и CD4 (табл. 1).

Инкубация же лимфоцитов с пептидом сопровождается увеличением экспрессии дифференцировочных маркеров на мембра-

не лимфоцитов. Изучаемый пептид обладает широким спектром действия, стимулируя экспрессию мембранных молекул T-, B-лимфоцитов и NK клеток: CD2, CD3, CD4, CD16, CD25, CD21, CD22 и CD23 (табл. 1).

Таким образом, синтезированный пептид оказывает стимулирующее влияние на экспрессию ряда кластеров дифференцировки лимфоцитов у онкологических больных.

Таблица 2

Влияние пептида на иммунный ответ у мышей, иммунизированных в первый день после введения циклофосфамида (в %), Me (25-75 процентиль).

Изучаемые показатели	Интактные мыши (контроль 1) (n=12)	Мыши после введения циклофосфамида	
		Физ. раствор (контроль 2) (n = 12)	Пептид (n = 12)
Титр гемагглютининов, \log_2	6,32 (5,95-6,78)	1,17 (0,90-1,36) $p_1 < 0,05$	1,42 (1,12-1,66) $p_2 > 0,05$
АОК селезенки, $\times 10^3$	9,24 (8,51-9,89)	1,32 (1,08-1,56) $p_1 < 0,05$	1,62 (1,41-1,86) $p_2 > 0,05$
Лейкоциты крови, $\times 10^9/\text{л}$	7,46 (7,02-7,92)	3,17 (2,84-3,44) $p_1 < 0,05$	3,29 (2,87-3,64) $p_2 > 0,05$

Примечание: (статистическая значимость различий): p_1 - между контролем 1 и 2, p_2 - между контролем 2 и опытом.

При иммунизации животных на следующий день после введения циклофосфамида наблюдалось практически полное угнетение иммунного ответа на ксеногенные эритроциты. Так, у мышей, иммунизированных на первые сутки после введения цитостатика, зарегистрировано уменьшение АОК на 85,6 %, титра гемагглютининов на 81,1% по сравнению с интактными животными. Количество лейкоцитов в периферической крови снижалось на 57,2 % (табл. 2).

Мы считаем, что уменьшение числа АОК является следствием токсического действия циклофосфамида на клетки иммунной системы, участвующие в формировании первичного гуморального иммунного ответа, в результате чего количество клеток, способных вступить в пролиферативно-дифференцировочные или бласттрансформаци-

онные процессы, резко снижено. Введение таким животным пептида не влияло на интенсивность иммунного ответа.

Таблица 3

Влияние пептида на иммунный ответ у мышей, иммунизированных на десятый день после введения циклофосфамида (в %), Me (25-75 перцентиль).

Изучаемые показатели	Интактные мыши (контроль 1) (n=12)	Мыши после введения циклофосфамида	
		Физ. раствор (контроль 2) (n = 12)	Пептид (n = 12)
Титр гемагглютининов, log ₂	6,32 (5,95-6,78)	3,58 (3,24-3,90) p ₁ < 0,05	6,83 (6,36-7,22) p ₂ < 0,05
АОК селезенки, x 10 ³	9,24 (8,51-9,89)	4,6 (4,23-4,96) p ₁ < 0,05	10,11 (9,31-10,93) p ₂ < 0,05
Лейкоциты крови, x 10 ⁹ /л	7,46 (7,02-7,92)	5,12 (4,82-5,40) p ₁ < 0,05	7,23 (6,83-7,65) p ₂ < 0,05

Примечание: (статистическая значимость различий: p₁ - между контролем 1 и 2, p₂ - между контролем 2 и опытом.

В случае же иммунизации через десять дней после инъекции циклофосфамида напряженность иммунитета возрастала. Введение пептида Trp-Thr-Ala-Glu-Glu-Lys-Gln-Leu этой группе животных приводило к значительному увеличению иммунного ответа на эритроциты барана, достигая в ряде случаев уровня интактных животных (табл. 3).

Так, под действием пептида у мышей, иммунизированных на десятые сутки после введения цитостатика, зарегистрировано увеличение АОК в 2,1 раза, гемагглютининов на 90,7% по сравнению с контрольной группой животных. Одновременно с этим увеличивалось количество лейкоцитов в периферической крови (таб. 3).

Динамика восстановления тимусзависимого иммунного ответа у мышей, получавших циклофосфамид имеет характерные закономерности и в ней можно выделить несколько основных этапов: период резкого снижения иммунного ответа непосредственно после воздействия, латентный период и период восстановления. Пептид неэффективен сразу после иммунодепрес-

сивного воздействия, когда происходит массовая гибель лимфоцитов и резко нарушены функции оставшихся клеток. Наибольшая эффективность пептида наблюдается в период восстановления иммунного ответа. Это можно объяснить тем, что к этому времени лимфоидные органы начинают заселяться лимфоцитами, находящимися на разных стадиях дифференцировки, в том числе и клетками-мишенями для пептида.

Таким образом, пептид восстанавливает гуморальный иммунный ответ в эксперименте на модели тяжелого комбинированного иммунодефицита, вызванного введением циклофосфамида. Пептид может служить основой для разработки иммуностимуляторов нового поколения и найти применение в клинике для лечения широкого круга иммунодефицитных состояний, в том числе иммунодепрессии у онкологических больных с цитостатической болезнью.

Выводы

1. Из ткани бурсы Фабрициуса выделен и синтезирован биологически активный пептид, имеющий структурную формулу: Trp-Thr-Ala-Glu-Glu-Lys-Gln-Leu.
2. В культуре лимфоцитов онкологических больных изучаемый пептид стимулирует экспрессию дифференцировочных антигенов Т-, В-лимфоцитов и NK-клеток (CD2, CD3, CD4, CD16, CD25, CD21, CD22, CD23).
3. На второй день после введения циклофосфамида у мышей наблюдается практически полное угнетение иммунного ответа на ксеногенные эритроциты. Введение пептида в эти сроки не влияет на интенсивность иммунного ответа.
4. В группе животных, иммунизированных на десятый день после инъекции циклофосфамида, пептид значительно увеличивает интенсивность иммунного ответа, что выражается в увеличении титра гемагглютининов, количества антителообразующих клеток в селезенке и лейкоцитов периферической крови.

ЛИТЕРАТУРА

1. Вишнякова Т.М. Влияние тималина на динамику цитокинов у детей с инфекционным эндокардитом [Электронный ресурс] / Т.М. Вишнякова, А.Б. Долина // Забайкальский медицинский вестник. - 2010. - № 1. - С. 12-14. - Режим доступа: <http://medacadem.chita.ru/zmv> (10 янв. 2010).
2. Гомазков О. А. Нейротрофическая регуляция и стволовые клетки мозга / О. А. Гомазков. - М. : ИКАР, 2006. - 330 с.
3. Иммунологические методы / Под ред. Г. Фримеля. - М.: Медицина, 1987. - 472 с.
4. Кузник Б.И. Теоретические и клинические аспекты биорегулирующей терапии в хирургии и травматологии / Б.И. Кузник, И.Д. Лиханов, В.Л. Цепелев. - Новосибирск : Наука, 2008. - 312 с.
5. Морозов В.Г. Пептидные тимомиметики / В.Г.Морозов, В.Х.Хавинсон, В.В. Малинин. - СПб.: Наука, 2000. - 400 с.
6. Петров Р.В. Миелопептиды / Р.В. Петров, А.А. Михайлова, Л.А. Фомина. - М. : Наука, 2001. - 184 с.
7. Степанов А.В. Пептидные регуляторы гуморального иммунитета / А.В.Степанов, В.Л.Цепелев, С.Л.Цепелев. - Чита : Книжное изд-во "Поиск", 2002. - 180 с.
8. Feng X.L. Identification and characterization of novel immunomodulatory bursal-derived pentapeptide-II (BPP-II) / X.L. Feng, Q.T. Liu, R.B. Cao // J. Biol. Chem. - 2012. - Vol. 3.- P. 801-807.
9. Feng X.L. A bursal pentapeptide (BPP-I), a novel bursal-derived peptide, exhibits antiproliferation of tumor cell and immunomodulator activity. / X.L. Feng, Q.T. Liu, R.B. Cao // Amino Acids. - 2012. - Vol. 42(6) .- P.2215-2222.
10. Liu X.D. Isolation, modulatory functions on murine B cell development and antigen-specific immune responses of BP11, a novel peptide from the chicken bursa of Fabricius / X.D. Liu, X.L. Feng, B. Zhou // - Peptides. - 2012. - Vol. 35(1). - P. 107-113.