

В. Л. Цепелев, С. Л. Цепелев, С. И. Курупанов

ИЗУЧЕНИЕ АКТИВНОСТИ СИНТЕТИЧЕСКИХ БУРСОПЕПТИДОВ ПРИ ИММУНОДЕФИЦИТЕ, ВЫЗВАННОМ ЦИКЛОФОСФАМИДОМ

Читинская государственная медицинская академия МЗ РФ

Обнаружена высокая иммуностимулирующая активность синтетических пептидов Tyr-Glu-Gly и Trp-Thr-Ala-Glu-Glu-Lys-Gln-Leu при экспериментальном иммунодефиците у мышей, вызванном введением цитостатика циклофосамида.

Ключевые слова: пептиды, иммунодефицит, антителообразующие клетки, циклофосамид

В лечении онкологических больных применяется цитостатик циклофосамид, обладающий иммуносупрессивным действием [1, 12]. Поэтому изучение средств, нивелирующих побочный эффект данного препарата, представляется крайне актуальным. Наиболее перспективный подход к решению данной проблемы – создание иммуностимуляторов на основе эндогенных биологически активных пептидов [2]. Важную роль в качестве продуцентов иммуоактивных пептидов играют центральные органы иммунной системы [6]. Известно, что экстракты бursы Фабрициуса – центрального органа гуморального иммунитета птиц – обладают иммунорегуляторными свойствами [11]. Однако химическая структура и молекулярные механизмы действия индивидуальных компонентов этих экстрактов до настоящего времени были неизвестны.

Целью данного исследования явилось сравнительное изучение биологической активности синтетических аналогов пептидов бursы Фабрициуса (бурсопептидов) при экспериментальном иммунодефиците, вызванном введением циклофосамида.

Методика. Пептиды из ткани бursы Фабрициуса цыплят породы “Смена-2” выделяли оригинальными методиками, включающими щелочную и уксусно-кислую экстракцию с последующим фракционированием экстрактов с помощью гель-фильтрации и обращенно-фазной высокоэффективной жидкостной хроматографии (ОФ-ВЭЖХ) [7, 8]. Первичную структуру выделенных пептидов определяли на газофазном секвенаторе MODEL 477A, (“Applied Biosystems”). Пептиды синтезировали на твердой фазе с использованием “Вос-схемы”.

Исследования проведены на 96 беспородных мышках-самцах массой 18–20 г. Циклофосамид вводили в максимально переносимой дозе – 200 мг/кг однократно, внутривентрально [13]. На следующий (1-я группа) или на 10-й день (2-я группа животных) после введения циклофосамида мышам иммунизировали корпускулярным тимус-зависимым антигеном – эритроцитами барана (ЭБ) внутривентрально в дозе 7×10^9 клеток/кг од-

нократно. Животным вводили бурсопептиды в дозе 5 нмоль/кг в 1, 2, 3 и 4-й дни после иммунизации. В контрольной группе использовали инъекции физиологического раствора. На 5-й день иммунного ответа у мышам контрольной и опытных групп определяли количество антителообразующих клеток (АОК) в селезенке методом локального гемолиза в геле [3], титр гемолизина и гемоглобулинов [4], а также число лейкоцитов периферической крови.

Статистическую обработку результатов проводили с использованием критерия Стьюдента.

Результаты. Выделение биологически активных пептидов из экстракта бursы Фабрициуса проводилось нами по принципу “от функции к структуре”. Фракционирование пептидных препаратов бursы выполняли поэтапно методами гель-фильтрации и ОФ-ВЭЖХ. На каждом этапе полученные фракции тестировались на наличие иммуностимулирующей активности. Дальнейшая работа велась только с наиболее активными фракциями. В результате препаративного разделения экстрактов бursы нами были выделены два индивидуальных пептида, обладающих иммуностимулирующей активностью; установлена их первичная структура и осуществлен химический синтез. Пептид структурной формулы Tyr-Glu-Gly получил условное название бурсопептид-1 (БП-1), а Trp-Thr-Ala-Glu-Glu-Lys-Gln-Leu – бурсопептид-2 (БП-2) (данный фрагмент работы выполнен совместно с Институтом биоорганической химии РАН им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова, Москва).

При анализе научно-технической и патентной литературы сведений о таких пептидах не обнаружено, что позволяет считать выделенные соединения новой группой иммуоактивных пептидов. Сопоставление аминокислотных последовательностей выделенных пептидов с известными эндогенными пептидами и белками показало, что БП-2 представляет собой фрагмент 3–10 β-цепи гемоглобина птиц. Необходимо отметить, что БП-2 – не единственный из фрагментов глобина, обладающий биологической активностью. Из супернатан-

та миелокариоцитов выделены миелопептиды, представляющие участки α - и β -цепей гемоглобина и проявляющие иммуностимулирующую активность [9]. Полученные факты подтверждают гипотезу о возможной роли гемоглобина как белка-предшественника для целого ряда биологически активных пептидов.

В экспериментах, проведенных нами ранее, было установлено, что бурсопептиды не обладают видовой специфичностью [10].

В предварительной серии экспериментов нами установлено, что исследуемые соединения проявляют максимальную активность *in vivo* в дозе 5 нмоль/кг, поэтому в настоящем исследовании применялась именно эта дозировка.

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%; гемолизинов – на 81,7% по сравнению с интактными животными. Количество лейкоцитов в периферической крови снижалось на 57,2% (табл. 1).

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 пролифератив-

но-дифференцировочные или бласттрансформационные процессы, резко снижено. Это подтверждают данные об уменьшении количества различных субпопуляций В-лимфоцитов в костном мозге и селезенке, числа Т-хелперов, а также клеток системы мононуклеарных фагоцитов [5]. Введение таким животным бурсопептидов не влияло на интенсивность иммунного ответа.

В случае же иммунизации через 10 дней после инъекции циклофосфамида напряженность иммунитета возрастала. Введение бурсопептидов этой группе животных приводило к значительному увеличению иммунного ответа на ЭБ, достигая в ряде случаев уровня интактных животных (табл. 2). При этом наибольшая активность отмечалась при применении БП-2. Так, под действием БП-2 у мышей, иммунизированных на 10-е сут после введения цитостатика, зарегистрировано увеличение АОК в 2,1 раза, титра гемолизинов – на 83,2%, гемагглютининов – на 90,7% по сравнению с контрольной группой животных. Одновременно с этим увеличивалось количество лейкоцитов в периферической крови (табл. 2).

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. Бурсопептиды неэффективны сразу после иммунодепрессивного

Таблица 1

Влияние бурсопептидов на иммунный ответ у мышей, иммунизированных в первый день после введения циклофосфамида

| Изучаемые показатели | Интактные мыши (контроль 1) (n = 12) | Мыши после введения циклофосфамида | | |
|-----------------------------------|--------------------------------------|------------------------------------|------------------------|------------------------|
| | | Физ. раствор (контроль 2) (n = 12) | Бурсопептид-1 (n = 12) | Бурсопептид-2 (n = 12) |
| Титр гемагглютининов, \log_2 | 6,3 \pm 0,42 | 1,17 \pm 0,27* | 1,33 \pm 0,28* | 1,42 \pm 0,29* |
| Титр гемолизинов, \log_2 | 4,1 \pm 0,38 | 0,75 \pm 0,22* | 1,0 \pm 0,25* | 0,92 \pm 0,19* |
| АОК селезенки, $\times 10^3$ | 9,2 \pm 0,81 | 1,32 \pm 0,17* | 1,53 \pm 0,16* | 1,62 \pm 0,21* |
| Лейкоциты крови, $\times 10^9$ /л | 7,4 \pm 0,48 | 3,17 \pm 0,31* | 3,43 \pm 0,33* | 3,29 \pm 0,44* |

Примечание. * – достоверное различие по сравнению с контролем 1 ($p < 0,05$).

Таблица 2

Влияние бурсопептидов на иммунный ответ у мышей, иммунизированных на десятый день после введения циклофосфамида

| Изучаемые показатели | Интактные мыши (контроль 1) (n = 12) | Мыши после введения циклофосфамида | | |
|-----------------------------------|--------------------------------------|------------------------------------|--------------------------|---------------------------|
| | | Физ. раствор (контроль 2) (n = 12) | Бурсопептид-1 (n=12) | Бурсопептид-2 (n=12) |
| Титр гемагглютининов, \log_2 | 6,3 \pm 0,42 | 3,58 \pm 0,34* | 4,92 \pm 0,44 \times | 6,83 \pm 0,47 \times |
| Титр гемолизинов, \log_2 | 4,1 \pm 0,38 | 2,5 \pm 0,29* | 3,33 \pm 0,33* | 4,58 \pm 0,38 \times |
| АОК селезенки, $\times 10^3$ | 9,2 \pm 0,81 | 4,6 \pm 0,37* | 8,3 \pm 0,68 \times | 10,11 \pm 0,78 \times |
| Лейкоциты крови, $\times 10^9$ /л | 7,4 \pm 0,48 | 5,12 \pm 0,29* | 5,21 \pm 0,34* | 7,23 \pm 0,4 \times |

Примечание. * – достоверное различие по сравнению с контролем 1 ($p < 0,05$); \times – достоверное различие по сравнению с контролем 2 ($p < 0,05$).

воздействия, когда происходит массовая гибель лимфоцитов и резко нарушены функции оставшихся клеток. Наибольшая эффективность бурсопептидов 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 бурсопептидов. Результаты данного исследования еще раз подтверждают способность бурсопептидов стимулировать дифференцировку В-лимфоцитов, обнаруженную нами ранее [10].

Таким образом, бурсопептиды восстанавливают гуморальный иммунный ответ в эксперименте на модели тяжелого комбинированного иммунодефицита, вызванного введением циклофосфамида. Бурсопептиды могут 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 цитостатической болезнью.

Выводы. Синтезированы аналоги биологически активных пептидов бursy Фабрициуса (бурсопептиды) – Tyr-Glu-Gly и Trp-Thr-Ala-Glu-Glu-Lys- Gln-Leu.

На второй день после введения циклофосфамида у мышей наблюдается практически полное угнетение иммунного ответа на ксеногенные эритроциты. Введение бурсопептидов в эти сроки не влияет на интенсивность иммунного ответа.

В группе животных, иммунизированных на 10-й день после инъекции циклофосфамида, бурсопептиды значительно увеличивают интенсивность иммунного ответа, что выражается в увеличении титра гемагглютининов, гемолизинов; количества антителообразующих клеток в селезенке и лейкоцитов периферической крови.

INVESTIGATION OF THE ACTIVITY OF SYNTHETIC BURSOPEPTIDES IN THE STATE OF EXPERIMENTAL IMMUNODEFICIENCY, CAUSED BY THE INJECTION OF CYCLOPHOSPHAMIDE

V.L. Tsepelev, S.L. Tsepelev, S.I. Kurupanov

High immunity stimulating activity of synthetic bursopeptides Tyr-Glu-Gly and Trp-Thr-Ala-Glu-Glu-Lys-Gln-Leu was discovered by experimental immunodeficiency of cyclophosphamide-treated mice.

ЛИТЕРАТУРА

1. Булкина З.П. Противоопухолевые препараты. Киев, 1991. С. 263–271.
2. Гомазков О.А. // Успехи соврем. биологии. 1996. Т. 116. № 1. С. 60–68.
3. Лимфоциты: Методы / Под ред. Дж. Клауса. М., 1990.
4. Линг Н.Р., Кэтти Д. Геммагглютинация и реакции антителозависимого гемолиза. Антитела. Методы. / Под ред. Д. Кэтти. М., 1991. Кн.1. С. 238–243.
5. Масная Н.В., Ратнер Г.Н. // Бюл. эксперим. биологии и медицины. 2000. Т. 129. № 4. С. 440–443.
6. Морозов В.Г., Хавинсон В.Х., Малинин В.В. Пептидные тимомиметики. СПб., 2000.
7. Патент 2155068 (РФ) от 27.08.2000 г. Способ получения вещества, стимулирующего антигеннезависимую дифференцировку В-лимфоцитов / Цепелев С.Л., Цепелев В.Л., Цыбиков Н.Н.
8. Патент 2177325 (РФ) от 27.12.2001 г. Способ получения вещества, обладающего иммуностимулирующей активностью / Цепелев В.Л., Цепелев С.Л., Цыбиков Н.Н.
9. Петров Р.В., Михайлова А.А., Фомина Л.А., Степаненко Р.Н. Миелопептиды. М., 2000.
10. Степанов А.В., Цепелев В.Л., Цепелев С.Л. Аюшиев О.Д. Пептидные регуляторы гуморального иммунитета. Чита, 2002.
11. Glich B. // Poult. Sci. 1994. Vol. 73. № 7. P. 979–983.
12. Mayumi N., Umesue M., Nomoto K. // Immunobiol. 1996. Vol. 195. № 2. P. 129–139.
13. Yoshikawa M., Tomita Y., Uchida T. // Transplant. Proc. 1999. Vol. 5. № 31. P. 1939–1941.