

ФАРМАКОЛОГИЯ

УДК 547.466:547.96:612.017.1:612.112.94

В. Л. Цепелев, С. Л. Цепелев

РЕЗУЛЬТАТЫ ДОКЛИНИЧЕСКОГО ИССЛЕДОВАНИЯ ЭФФЕКТИВНОСТИ СИНТЕТИЧЕСКОГО ИММУНОСТИМУЛЯТОРА НОВОГО ПОКОЛЕНИЯ – БУРСОПЕПТИДА-2

Читинская государственная медицинская академия МЗ РФ

Из ткани бursы Фабрициуса выделен и синтезирован биологически активный пептид бурсопептид-2 (Trp-Thr-Ala-Glu-Glu-Lys-Gln-Leu). Установлено, что бурсопептид-2 стимулирует экспрессию дифференцировочных антигенов Т-, В-лимфоцитов и NK-клеток, увеличивает количество антителообразующих клеток и стимулирует иммунный ответ. Предполагается, что бурсопептид-2 может служить основой для разработки нового иммуноактивного лекарственного препарата для лечения широкого спектра иммунодефицитных состояний.

Ключевые слова: пептид, лимфоциты, иммуностимуляция

Поиск средств избирательного воздействия на отдельные этапы развития иммунного ответа, а также на отдельные субпопуляции клеток иммунной системы является одним из ведущих направлений экспериментальной и клинической иммунологии [2, 12]. Наиболее перспективный подход к решению данной проблемы – создание иммуностимуляторов на основе эндогенных биологически активных веществ пептидной природы [1].

Важную роль в качестве продуцентов иммуноактивных пептидов играют центральные органы иммунной системы. Достаточно хорошо изучены пептиды тимуса [6] и костного мозга [5, 9]. Значительно меньше данных, касающихся пептидных регуляторов из бursы Фабрициуса – центрального органа гуморального иммунитета птиц, аналог которого у человека не идентифицирован. Известно, что экстракты бursы Фабрициуса обладают иммунорегуляторными свойствами [10, 11], однако состав и молекулярные механизмы действия индивидуальных компонентов этих экстрактов до настоящего времени были неизвестны.

Целью настоящего исследования явилось изучение иммунологической активности бурсопептида-2 (БП-2), выделенного из экстракта бursы Фабрициуса.

Методика. Пептиды из ткани бursы Фабрициуса цыплят выделяли оригинальной методикой, включающей уксусно-кислую экстракцию с последующим фракционированием с помощью гelfильтрации и обращенно-фазной высокоэффективной жидкостной хроматографии (ОФ-ВЭЖХ) [7]. Первичную структуру выделенного пептида определяли на газофазном секвенаторе MODEL 477A ("Applied Biosystems"). Пептиды синтезировали на твердой фазе с использованием "Вос-схе-

мы"; структуру синтезированного пептида подтверждали масс-спектрометрическим анализом.

Лимфоциты 16 больных с ожогами IIIб-IV степени выделяли на градиенте плотности фиколл-всрографин ($\rho=1,077 \text{ г/см}^3$) и использовали в концентрации 2,5 млн клеток/мл. БП-2 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 и IgM-рецепторов определяли методом непрямой мембранной иммуофлюоресценции с моноклональными антителами ("Сорбент", Москва; "Sigma", США) [4]. Флюоресценцию регистрировали с помощью люминесцентного микроскопа ЕС ЛЮАМ-РПО11. Просматривали не менее 200 лимфоцитов. Флюоресцентная микроскопия мембранных маркеров сопровождалась морфологическим контролем клеток в фазовом контрасте.

Влияние БП-2 на интенсивность иммунного ответа изучено на 92 цыплятах породы "Смена-2". На 19-е сут инкубации у 72 эмбрионов произведена бурсэктомия. Остальные эмбрионы в эти же сроки были подвергнуты ложной бурсэктомии с воспроизведением всех этапов операции за исключением удаления бursы. В первой серии экспериментов изучали влияние БП-2 на индуктивную фазу иммунного ответа. С этой целью бурсэктомизированные птицы, начиная с месячного возраста, получали исследуемый препарат в течение трех дней. В данной модели использована наиболее оптимальная дозировка – 5 нмоль/кг, определенная нами в предварительных исследованиях активности БП-2 в диапазоне доз от 0,5 до 50 нмоль/кг. Затем птиц иммунизировали эритроцитами барана (ЭБ) внутрибрюшинно в дозе 7×10^9 клеток/кг и че-

рез 5 сут определяли состояние иммунитета. В следующей серии экспериментов исследовали действие БП-2 на продуктивную фазу иммунного ответа, для чего исследуемое вещество вводили цыплятам на 2, 3 и 4-е сут после иммунизации. На 5-е сут определяли титр антител к ксеногенным эритроцитам в реакциях гемагглютинации и гемолиза [3]; число антителообразующих клеток (АОК) селезенки – методом локального гемолиза в геле [13].

С целью изучения влияния БП-2 на антителогенез неинбредных крыс-самцов иммунизировали введением подкожно в подушечки конечностей 0,1 мл 5% суспензии ЭБ. Через 2 недели проводили повторную иммунизацию тем же антигеном и в той же дозе. На пике вторичного иммунного ответа (4-е сут после повторной иммунизации) крыс забивали; клетки подколенных и паховых лимфатических узлов в концентрации 2×10^6 клеток/мл инкубировали с БП-2 в концентрации 5×10^{-4} – 5×10^{-2} пмоль/мл в течение 12–14 ч при 37°C в полной питательной среде. По окончании инкубации в каждой культуре определяли количество АОК.

Статистическую обработку результатов проводили с использованием критерия Стьюдента.

Результаты. Фракционирование экстракта бursy Фабрициуса проводили поэтапно методами гель-фильтрации и ОФ-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 бursy Фабрициуса, нами был выделен пептид, обладающий по результатам скрининговых исследований иммуностимулирующей активностью, и установлена его первичная структура. Октапептид Tgr-Thr-Ala-Glu-Glu-Lys-Gln-Leu получил условное название БП-2 [12]. Расширенное исследование иммунологической активности БП-2 проводили на его синтетическом аналоге. Пептиды синтезировали на твердой фазе с использованием “Вос-схемы”; структуру синтезированных пептидов подтверждали масс-спектрометрическим анализом (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 данном пептиде не обнаружено, что позволяет считать выделенное соединение новым иммуноактивным пептидом. В исследованиях, проведенных нами ранее, было установлено, что БП-2 не обладает видовой специфичностью [11].

Известно, что лимфоциты несут на своей мембране маркеры CD, способные выполнять функцию рецепторов, сигнальных или адгезивных молекул. Способность веществ усиливать или ослаблять экспрессию кластеров дифференцировки иммуноци-

тов и, тем самым, модулировать их функцию отражает иммуотропную активность препаратов. Нами исследовано влияние БП-2 на экспрессию поверхностных маркеров лимфоцитов больных ожоговой болезнью, при которой наблюдается тяжелый комбинированный иммунодефицит.

При ожоговой травме резко снижается количество лимфоцитов, несущих на своей поверхности все изучаемые кластеры дифференцировки, особенно антигены CD3 и CD4 (табл. 1). Инкубация же лимфоцитов с БП-2 сопровождается увеличением экспрессии дифференцировочных маркеров на мембране лимфоцитов. БП-2 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).

Установлено, что у больных с ожогами более чем в 1,5 раза снижено количество лимфоцитов, несущих на своей мембране IgM (рис. 1). Под действием БП-2 экспрессия поверхностного IgM возрастает на 58,1% от исходного уровня. Нами ис-

Таблица 1

Влияние бурсопептида-2 на экспрессию дифференцировочных антигенов лимфоцитов больных с ожогами (в %)

Изучаемые кластеры дифференцировки	Лимфоциты здоровых доноров (контроль 1) (n=16)	Лимфоциты больных с ожогами	
		Физ. раствор (контроль 2) (n = 16)	Бурсопептид-2 (n = 16)
CD2	82,4±1,19	59,73±1,24 p ₁ < 0,001	81,66±1,21 p ₂ < 0,001
CD3	70,4±1,73	45,79±1,37 p ₁ < 0,001	68,36±1,58 p ₂ < 0,001
CD4	39,6±0,85	12,46±0,84 p ₁ < 0,01	31,37±1,21 p ₂ < 0,001
CD8	25,1±0,74	18,69±0,67 p ₁ < 0,01	19,54±0,85 p ₂ > 0,4
CD16	13,8±0,71	10,21±1,01 p ₁ < 0,05	13,39±0,98 p ₂ < 0,05
CD25	7,9±0,52	3,2±0,31 p ₁ < 0,01	8,22±0,46 p ₂ < 0,001
CD19	9,5±0,83	5,86±0,56 p ₁ < 0,01	6,14±0,53 p ₂ > 0,05
CD21	8,9±0,87	4,63±0,43 p ₁ < 0,001	8,46±0,62 p ₂ < 0,001
CD22	9,9±0,74	5,21±0,67 p ₁ < 0,01	7,41±0,69 p ₂ < 0,05
CD23	5,8±0,24	3,17±0,38 p ₁ < 0,01	6,21±0,45 p ₂ < 0,001
CD72	7,3±0,48	5,17±0,43 p ₁ < 0,05	5,9±0,35 p ₂ > 0,05

Примечание. p₁ – достоверность различий по сравнению с контролем 1;

p₂ – достоверность различий по сравнению с контролем 2.

следовано действие БП-2 в широком диапазоне концентраций от 0,0005 до 500 пмоль/мл. При этом обнаружен доза-эффект действия препарата. Максимальная активность БП-2 наблюдается при концентрации 5 пмоль/мл (рис. 1).

Таким образом, БП-2 оказывает стимулирующее влияние на экспрессию ряда кластеров дифференцировки лимфоцитов.

Эмбриональная бурсэктомия представляет собой идеальную модель иммунодефицита с преимущественным поражением гуморального звена иммунитета, сопровождающегося нарушением антигеннезависимой дифференцировки В-лимфоцитов, снижением их числа, а также угнетением гуморального иммунного ответа как на Т-, так и на В-зависимый антиген [14]. Поэтому мы решили оценить действие БП-2 на состояние иммунитета у цыплят с удаленной в период эмбриогенеза бурсой Фабрициуса.

У эмбрионально бурсэктомизированных птиц снижается иммунный ответ на введение ксеногенных эритроцитов (табл. 2). Введение БП-2 бурсэктомизированным птицам в индуктивную фазу иммунного ответа приводит к увеличению титра гемагглютининов и гемолизинов в 2,7 и 2,5 раза соответственно, числа антителообразующих клеток в селезенке – в 1,8 раз. В продуктивную фазу иммунного ответа БП-2 был неэффективен (табл. 2).

В следующей серии экспериментов было установлено, что БП-2 способен увеличивать число АОК на пике иммунного ответа в популяции зрелых антителопродуцентов (рис. 2). Нами зарегистрирован доза-эффект. Максимальная активность БП-2 наблюдается в концентрациях от 0,05 до 0,5 пмоль/мл, достигая 75% от исходного уровня (рис. 2).

Можно предположить, что БП-2, будучи биологически активным соединением, должен

осуществлять свои функции через рецепторы на клетках-мишенях. Поэтому мы решили проанализировать возможность связывания БП-2 с поверхностью лимфоидных клеток. Для этого флуоресциенизотиоцианат-меченный БП-2 (ФИТЦ-БП-2) инкубировали с суспензией клеток селезенки мыши 30 мин при 4°C. После инкубации клетки отмывали дважды и изучали с помощью иммуноф-

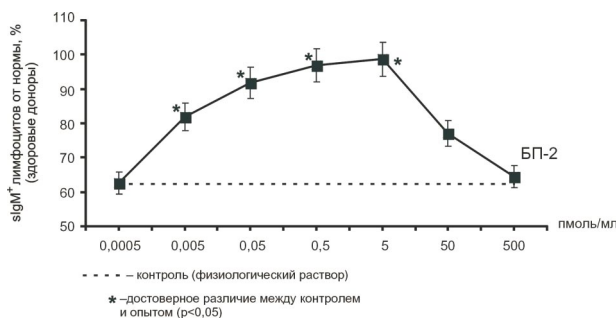


Рис. 1. Влияние бурсопептида-2 на экспрессию IgM-рецепторов лимфоцитов больных с ожогами

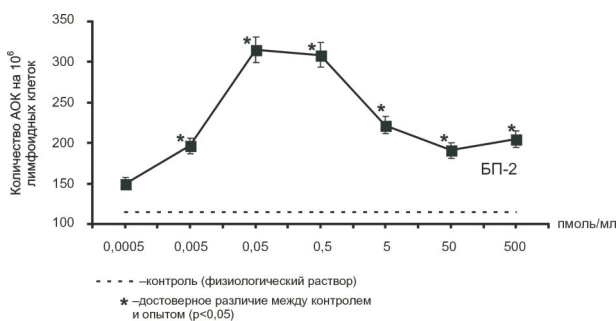


Рис. 2. Влияние бурсопептида-2 на количество АОК в культуре лимфоидных клеток иммунных лимфатических узлов крыс

Таблица 2

Влияние бурсопептида-2 на индуктивную и продуктивную фазы иммунного ответа у эмбрионально бурсэктомизированных цыплят

Изучаемые показатели	Ложно-оперированные цыплята (n=20)	Бурсэктомизированные цыплята			
		Индуктивная фаза		Продуктивная фаза	
		физ. раствор (контроль) (n=19)	БП-2 (n=18)	физ. раствор (контроль) (n=18)	БП-2 (n=16)
Титр гемагглютининов, log ₂	6,1±0,49	0,95±0,27 p ₁ <0,001	2,61±0,32 p ₁ <0,01 p ₂ <0,001	0,78±0,21 p ₁ <0,001	1,25±0,32 p ₁ <0,001 p ₂ >0,05
Титр гемолизинов, log ₂	3,85±0,42	1,21±0,27 p ₁ <0,001	3,06±0,41 p ₁ >0,05 p ₂ <0,001	1,33±0,31 p ₁ <0,001	1,88±0,4 p ₁ <0,001 p ₂ >0,05
АОК селезенки, × 10 ³	14,15±0,57	4,84±0,45 p ₁ <0,001	8,67±0,52 p ₁ <0,01 p ₂ <0,001	3,61±0,48 p ₁ <0,001	4,94±0,52 p ₁ <0,001 p ₂ >0,05

Примечание. p₁ – достоверность различий по сравнению с ложнооперированными цыплятами; p₂ – достоверность различий по сравнению с бурсэктомизированными цыплятами, получавшими физ. раствор.

люоресцентного анализа. Всего в суспензии селезеночных клеток выявлялось 23% ФИТЦ-положительных клеток. Добавление немеченого БП-2 в инкубационную смесь в избыточном количестве приводило к уменьшению количества ФИТЦ-положительных клеток вследствие вытеснения ФИТЦ-БП-2 немеченым БП-2. Данный эффект не наблюдался при добавлении других пептидов: БП-1 (Tyr-Glu-Gly), тимогена (Glu-Trp). Это свидетельствует о том, что связывание БП-2 с клетками-мишенями было специфическим. Полученные факты позволяют нам предполагать, что на лимфоидных клетках имеются рецепторы к БП-2.

Таким образом, бурсопептид-2 обладает выраженным иммуностимулирующим действием, оказывая влияние преимущественно на В-клеточное звено иммунитета. На наш взгляд, клетками-мишенями для бурсопептида-2 являются лимфоциты, находящиеся на различных стадиях онтогенеза – начиная от клеток-предшественников и заканчивая зрелыми антителопродуцентами. Расшифровка структуры, синтез и изучение механизмов действия индивидуальных пептидов бursы Фабрициуса открывают перспективу для разработки лекарственных средств нового поколения, производящих направленную коррекцию поврежденных звеньев иммунитета.

Выводы. Из ткани бursы Фабрициуса выделен и синтезирован биологически активный пептид – БП-2, имеющий структурную формулу: Trp-Thr-Ala-Glu-Glu-Lys-Gln-Leu.

В культуре лимфоцитов больных с ожогами БП-2 стимулирует экспрессию дифференцировочных антигенов Т-, В-лимфоцитов и NK-клеток (CD2, CD3, CD4, CD16, CD25, CD21, CD22, CD23). Бурсопептид-2 дозозависимо стимулирует экспрессию IgM на мембране лимфоцитов больных с ожогами. Максимальная активность БП-2 отмечается в концентрации 5 пмоль/мл.

БП-2 увеличивает количество антителообразующих клеток на пике иммунного ответа в популяции зрелых антителопродуцентов. Зарегистрирован доза-эффект действия БП-2 с максимальной активностью в концентрациях от 0,05 до 0,5 пмоль/мл.

При эмбриональной бурсэктомии БП-2 стимулирует иммунный ответ на Т-зависимый антиген в индуктивную фазу, что выражается в увеличении

титра гемагглютининов, гемолизинов и количества антителообразующих клеток в селезенке.

RESULTS OF THE PRECLINICAL RESEARCH OF EFFECTIVENESS OF SYNTHETIC IMMUNOSTIMULATOR OF THE NEW GENERATION – BURSOPEPTIDE-2

V.L. Tsepelev, S.L. Tsepelev

Biologically active peptide bursopeptide-2 (Trp-Thr-Ala-Glu-Glu-Lys-Gln-Leu) – was isolated from tissue of avian bursa of Fabricius and synthesised. Bursopeptide-2 has been found to boost an expression of clusters of differentiation on T-, B-lymphocytic surface and NK-cells, to increase the number of antibody producing cells, to enhance immune response. Receptors for bursopeptide-2 have been found on the lymphocytic surface. There is ground to believe that bursopeptide-2 can form a basis for the development of new immuno regulatory remedy for treatment of a wide spectrum of immuno deficient states.

ЛИТЕРАТУРА

1. Гомазков О.А. // Успехи соврем. Биологии. 1996. Т. 116. № 1. С. 60–68.
2. Земсков В.М., Земсков А.М. // Иммунология. 1996. № 3. С. 4–6.
3. Иммунологические методы / Под ред. Г. Фримеля. М., 1987.
4. Лимфоциты: Методы / Под ред. Дж. Клауса. М., 1990.
5. Михайлова А.А. // Иммунология. 1999. № 4. С. 14–17.
6. Морозов В.Г., Хавинсон В.Х., Малинин В.В. Пептидные тимомиметики. СПб., 2000.
7. Патент 2177325 (РФ) от 27.12.2001 г. Способ получения вещества, обладающего иммуностимулирующей активностью / Цепелев В.Л., Цепелев С.Л., Цыбиков Н.Н.
8. Патент 2177803 (РФ) от 10.01.2002 г. Средство обладающее 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. Влияние полипептидов из сумки Фабрициуса на состояние иммуногенеза и гемостаза: Автореф. дис. ... канд. мед. наук. Томск, 1988.
11. Степанов А.В., Цепелев В.Л., Цепелев С.Л., Аюшиева О.Д. Пептидные регуляторы гуморального иммунитета. Чита, 2002.
12. Хаитов Р.М., Пинегин Б.В. // Иммунология. 1996. № 6. С. 4–9.
13. Jerne N.K., Henry C., Nordin A.A. et al. // Transplant. Rev. 1974. Vol. 18. P. 130–131.
14. Moriya C. // Vet. Immunol. Immunopathol. 1987. Vol. 16. № 1–2. P. 77–84.