

Особенности влияния лизил-глутамата на гуморальный иммунный ответ у мышей

Белорусский государственный медицинский университет

Изучено влияние лизил-глутамата при однократном внутрибрюшинном введении на гуморальный иммунный ответ путем определения продукции антителообразующих клеток в селезенках мышей линии СВА. Субстанция представляет собой дипептид из остатков аминокислот лизина и глутамата, воспроизводящий основные свойства гормонов тимуса. Проведенное исследование показало, что лизил-глутамат в диапазоне доз 1 – 1000 мкг/кг не влияет на гуморальный иммунный ответ при однократном введении.

Ключевые слова: гуморальный иммунный ответ, иммуномодуляторы, тимомиметические пептиды, гормоны тимуса, аминокислоты, антителообразующие клетки, спленоциты

По современным представлениям иммуномодуляторами называют класс фармакологических средств, обладающих иммунотропной активностью, способных в терапевтических дозах восстанавливать функции иммунной системы и обеспечивать эффективную иммунную защиту [6]. Препараты тимусного происхождения (тимомиметические пептиды) являются одними из наиболее перспективных иммуномодулирующих средств: обладают мягким корригирующим эффектом при практически полном отсутствии побочных эффектов и осложнений, поэтому широко применяются для лечения заболеваний, связанных с вторичной иммунологической недостаточностью [3, 8]. Биологическая роль тимических факторов заключается в тканеспецифической регуляции клеточного гомеостаза и защитных систем организма [3]. Тимомиметические пептиды оказывают разностороннее действие на гуморальный и клеточный иммунитет, воспроизводя структуру и эффекты гормоноподобных веществ тимуса (тимулин, ?1-, ?4-тимозин, тимопоэтины I, II и др.) [2]. Гуморальные факторы тимуса оказывают влияние на всю периферическую иммунную систему, стимулируя рост и пролиферацию лимфоидных клеток, преимущественно Т-лимфоцитов [6]. Известно, что спектр функций тимических гормонов зависит от аминокислотной последовательности входящих в них пептидов и их гидрофильно-гидрофобных свойств [7]. В настоящее время существует много препаратов гуморальных факторов тимуса – комплексных и мономолекулярных, естественных и синтетических [8]. Синтетические тимопептиды, повторяющие структуру нативных гормонов тимуса или являющиеся их модифицированными аналогами, обладают лучшими возможностями для стандартизации препаратов.

Одним из перспективных иммуномодуляторов является дипептид лизил-глутамат, представляющий собой структурный элемент многих гормонов тимуса и синтезированный на основании статистического анализа аминокислотного состава тималина (В.Г. Морозов, В.Х. Хавинсон). [3, 7]. Отличительным свойством этой субстанции является разделение электростатических зарядов между концами аминогрупп, что позволяет дипептиду участвовать в электростатических взаимодействиях [7]. Перспективность лизил-глутамата обусловлена его регуляторным и иммуномодулирующим влиянием на механизмы регенерации и

канцерогенеза, поэтому изучается возможность его использования в качестве геропротекторного средства [3, 5].

Цель настоящего исследования – изучение влияния однократного введения лизил-глутамата на гуморальный иммунный ответ в широком диапазоне доз.

Материал и методы

Лизил-глутамат синтезирован по оригинальной технологии в Институте физико-органической химии НАН Беларуси (В.А. Книжников).

Экспериментальные исследования проведены на 50 мышах высокоотвечающей линии СВА первого поколения массой 17-26 г (самки; питомник «Рапполово», Санкт-Петербургская обл.). Группы составляли животные одного возраста, рацион питания был стандартным. Условия содержания мышей соответствовали общепринятым нормам. Введение испытуемой субстанции осуществлялось в одно и то же время суток (днем). Забой животных проводился с помощью цервикальной дислокации.

Группы составлялись с учетом расчета необходимого объема выборки при проведении стратифицированной рандомизации мышей по массе тела. Выбранные дозы испытывали на 11 мышах при 3-х кратном воспроизведении эксперимента (по 3-4 мыши в группах). В исследовании использованы дозы, отличающиеся порядковыми значениями (1 – 1000 мкг/кг): изучался диапазон, включающий эффективные дозы для животных известных тимомиметиков.

В качестве гетерологичного антигена применяли эритроциты барана, наиболее полно моделирующие различные варианты чужеродного агента (корпускулярный, Т-зависимый, содержащий множество антигенных детерминант) и являющиеся оптимальным выбором для стимуляции антителообразования среди существующих активаторов (эритроциты мыши и др.). Животных иммунизировали внутрибрюшинным введением субоптимальной дозы (2Ч107) эритроцитов барана. Подопытным мышам однократно через 10 минут после иммунизации внутрибрюшинно вводили испытуемую субстанцию, разведенную на физрастворе, в дозах 1, 10, 100 и 1000 мкг/кг по 0,1 мл на 10 г массы тела. Контрольные животные получали внутрибрюшинно плацебо (физраствор) однократно по аналогичной схеме.

Гуморальный иммунный ответ определяли по количеству антителообразующих клеток (АОК), секретирующих антитела класса М, прямым безгелевым методом локального гемолиза по А.Г. Cunningham [9] на 5-е сутки после иммунизации: мышей забивали, извлекали селезенки, гомогенизировали, отмывали спленоциты дважды и готовили суспензию спленоцитов, добавляя к осадку клеток 5 мл среды 199. Содержание эритроцитов и спленоцитов подсчитывалось в камере Горяева в 2-х полях с вычислением среднего значения. Для подсчета ядродержащих клеток селезенки 20 мкл суспензии разводили в 4 мл 3%-ной уксусной кислоты.

Реакционная смесь, заполнявшая стеклянные камеры Каннингема, состояла из 20 мкл суспензии спленоцитов, 0,5 мл взвеси эритроцитов барана (0,7?109/мл), приготовленных на среде 199, и 0,5 мл комплемента сыворотки морской свинки (разведение в физрастворе 1:5). Камеры инкубировали в течении 1,5 ч при 37?С и визуально подсчитывали зоны гемолиза.

Учитывали следующие показатели: массу селезенки, количество спленоцитов (10⁶/мл), количество спленоцитов на 100 мг селезенки, а также количество АОК на селезенку, 106 ядродержащих клеток и 100 мг селезенки.

Статистическую обработку проводили с использованием пакета Statistica 6.0 (StatSoft Inc., США) [1]. Были использованы непараметрические критерии сравнения

нескольких групп (Краскела – Уоллиса, медианный тест), для анализа зависимостей применяли коэффициент ранговой корреляции Спирмена.

Результаты и обсуждение

Воспроизводимость (точность) счета АОК в камерах Каннингема, рассчитанная с помощью коэффициента вариации (C_v), по трехкратному анализу составила в среднем 23%, счета спленоцитов по двукратному анализу ? в среднем 12% по всем группам. По литературным данным, в небольших выборках из нормальной генеральной совокупности величина C_v не должна превышать 33%, поэтому точность подсчета показателей антителопродукции и клеточности селезенки была высокой.

Проверка нормальности распределения проводилась с помощью критерия Колмогорова – Смирнова и Шапиро – Уилкса W-теста [1]. Установлено, что распределение полученных в исследовании показателей отличается от нормального (асимметричное с большим разбросом значений), поэтому для статистической обработки результатов использовались непараметрические методы и результаты эксперимента представлены в виде медианы и квартилей (табл.).

Показатели антителопродукции и клеточности селезенки при однократном введении лизил-глутамата

Доза, мкг/кг	n	Сел., мг			АОК/10 ⁶			АОК/сел., x 10 ³			АОК/100 мг, x 10 ³			Сплен./100 мг, x 10 ⁴		
		25%	Me	75%	25%	Me	75%	25%	Me	75%	25%	Me	75%	25%	Me	75%
Плацебо (контроль)	11	53,0	62,0	72,0	23,0	25,5	29,5	101,0	122,0	290,0	14,0	23,0	26,0	21,0	27,0	49,0
1	10	58,0	70,0	78,0	19,0	27,8	33,5	128,0	179,5	352,0	18,0	28,0	34,0	31,0	45,0	55,0
10	10	46,0	59,5	73,0	20,5	25,2	42,3	83,0	131,0	190,0	15,0	18,5	33,0	19,0	35,0	39,0
100	10	64,0	74,5	81,0	24,3	28,7	30,8	131,0	167,5	227,0	20,0	25,5	27,0	25,0	31,0	43,0
1000	9	60,0	63,0	78,0	21,8	29,3	35,5	95,0	141,0	156,0	15,0	20,0	25,0	25,0	28,0	34,0

Примечание: n – число животных, Сел. – масса селезенки, АОК/10⁶ – количество АОК на 10⁶ спленоцитов, АОК/сел. – количество АОК на селезенку, АОК/100 мг – количество АОК на 100 мг селезенки, Сплен./100 мг – количество спленоцитов на 100 мг селезенки, 25%, 75% – квартили, Me – медиана.

Для сравнения различных показателей АОК и определения их степени надежности был рассчитан коэффициент ранговой корреляции Спирмена r_s . Этот непараметрический метод оценки зависимости можно применять, когда связь нелинейна и не требует какого-либо типа распределения, что позволяет его

использовать для определения силы (тесноты) связи результатов исследования. Выявленная по всем группам сильная корреляционная связь показателей АОК/10? ? АОК/сел. ($r_s=0,85$, $p<0,001$), АОК/10? ? АОК/100 мг ($r_s=0,92$, $p<0,001$) и АОК/сел ? АОК/100 мг ($r_s=0,88$, $p<0,001$) с высокой степенью достоверности позволяет использовать любой из них для объективного отражения процесса антителообразования.

Для проверки значимости различий экспериментальных выборок по показателям антителопродукции и содержания спленоцитов в селезенках применяли критерий Краскела – Уоллиса и медианный тест. В результате изучения иммуномодулирующих свойств лизил-глутамата установлено, что при однократном введении различных доз дипептида (1 – 1000 мкг/кг) иммунизированным мышам показатели антителообразования по этим статистическим критериям оказались незначимыми: количество АОК на 106 спленоцитов ($p=0,60$; 0,48), на селезенку ($p=0,64$; 0,64) и на 100 мг селезенки ($p=0,46$; 0,43).

Таким образом, однократное введение субстанции не повышает продукцию АОК в селезенках мышей ($p>0,05$). По одной из гипотез, наличие стимулирующего эффекта в отношении антителопродукции у лизил-глутамата связано с активацией клеточных популяций, содержащих РНА-связывающие участки, и подавлением экспрессии рецепторов В-лимфоцитов для посткапиллярных венул лимфоидных органов, что способствует накоплению и удерживанию АОК в зародышевых центрах селезенки [3]. Имеются данные о повышении содержания внутриклеточного Ca^{2+} в тимоцитах и макрофагах в результате введения субстанции, что является показателем начала клеточной активации [3, 5]. Важным условием активации (переход из состояния покоя в фазу G1 клеточного цикла) является каскадный процесс передачи сигналов от мембранных рецепторов к ядру, происходящий с участием многих внутриклеточных факторов [8]. В дальнейшем происходит активация генов ростовых факторов лимфоцитов и их рецепторов [8]. Экспериментальные исследования субстанции выявили также способность лизил-глутамата оказывать стимулирующее влияние на интерлейкин-2 в спленоцитах мышей, что подтверждает возможность проникновения дипептидов через клеточную мембрану, их участие в регуляции экспрессии генов и доставке трансфакторов в ядро [3]. Результаты настоящего исследования показывают, что введения всего одной дозы лизил-глутамата недостаточно для запуска механизмов активации и последующей дифференцировки иммунокомпетентных клеток с дальнейшим развитием полноценного гуморального иммунного ответа.

Несмотря на отсутствие достоверного иммуномодулирующего действия лизил-глутамата, на диаграмме размаха («box-plot») видно, что при однократном введении субстанции в дозах порядка 1 – 100 мкг/кг наблюдалось смещение верхних квартилей (75%) и особенно максимальных значений показателей антителопродукции в сторону повышения (рис.). Можно полагать, что многократное (систематическое) введение дипептида позволило бы достичь значимого иммуномодулирующего эффекта.

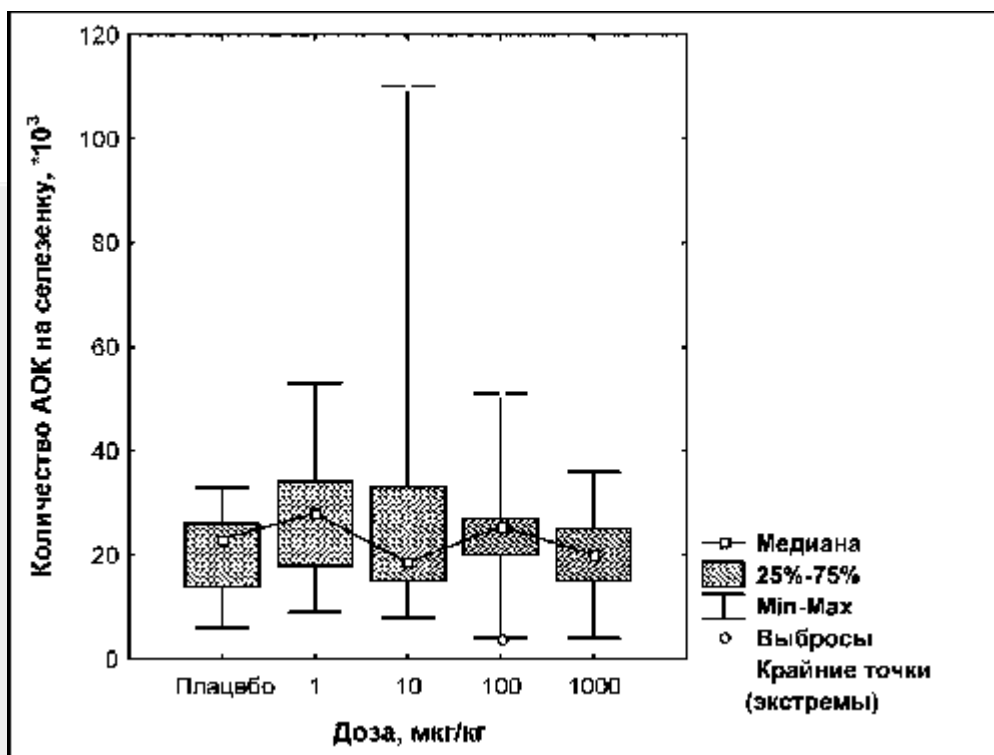


Рис. Количество антителообразующих клеток в селезенках мышей при однократном введении лизил-глутамата

Важным аспектом иммуотропного действия лизил-глутамата является его влияние на клеточность селезенки. Используемые критерий Краскела – Уоллиса и медианный тест выявили отсутствие значимого различия по массе селезенки ($p=0,42$; $0,43$), количеству спленоцитов в суспензии ($p=0,94$; $0,80$) и количеству спленоцитов на 100 мг селезенки ($p=0,24$; $0,43$). Таким образом, исследование показало, что введение испытуемого пептида в широком диапазоне доз после иммунизации эритроцитами барана достоверно не повышает показатели клеточности селезенки ($p>0,05$).

Известно, что короткие синтетические пептиды, являющиеся фрагментами природных тимических гормонов, обладают выраженной иммунной активностью и участвуют в процессах регуляции роста лимфоидных органов. Их действие зависит от степени зрелости популяций иммунокомпетентных клеток и их происхождения [3]. Имеются экспериментальные данные о стимулирующем влиянии лизил-глутамата на стромальное микроокружение клеток селезенки (макрофаги, фибробласты, тучные клетки, эндотелиальные и ретикулярные клетки) только у старых животных (в старых и переживающих культурах), в отличие от других синтетических тимомиметиков [5, 7]. На органотипических культурах тимуса субстанция вызывала стимуляцию роста ткани как старых, так и молодых животных [5]. Стимулирующее влияние дипептида на рост селезенки старых животных может быть связано со снижением функциональной активности иммунокомпетентных клеток, обусловленной старением [3]. Поэтому на фоне наблюдаемого вторичного иммунодефицитного состояния у старых животных субстанция способствует стимуляции роста культуры спленоцитов.

Зависимость влияния лизил-глутамата на рост лимфоидной ткани у животных разного возраста доказывает также исследование массы эксплантантов тимуса и селезенки в культуральной среде при добавлении субстанции у 1- и 21-дневных крыс, когда животные имеют различную иммунологическую реактивность [3]. Установлено стимулирующее влияние дипептида на рост ткани тимуса и селезенки 21-дневных крыс, и уменьшение массы эксплантантов этих органов у 1-дневных животных. Противоположная направленность роста тимоцитов и спленоцитов в этих возрастных

группах обусловлена процессами селекции Т-клеток в тимусе и формированием иммунологической толерантности в процессе неонатального развития [3].

В настоящем исследовании изучали иммуномодулирующее действие лизил-глутамата у молодых животных (1-3 мес), поэтому отсутствие значимого повышения количества спленоцитов в селезенках мышей согласуются с ранее полученными экспериментальными данными других авторов [3, 5, 7]. Можно предположить, что лизил-глутамат не влияет на запуск классического варианта активации стромальных клеток микроокружения селезенки у молодых животных, т.е. отсутствует митогенный эффект.

Выводы:

- 1) Лизил-глутамат в диапазоне доз 1 – 1000 мкг/кг не влияет на гуморальный иммунный ответ при однократном введении.
- 2) Лизил-глутамат не влияет на пролиферацию лимфоидных клеток селезенки в ответ на введение корпускулярного антигена у молодых мышей (1-3 мес), что свидетельствует об отсутствии митогенного эффекта.

Литература

1. Боровиков В. STATISTICA. Искусство анализа данных на компьютере: Для профессионалов. 2-е изд. – СПб. – Питер. – 2003. – 688 с.
2. Вегнер Р.Э., Ритума И.Р., Чипенс Г.И. Структура и биологические свойства тимопоэтина II, тимозина ?1, их фрагментов и аналогов // Изв. АН ЛатвССР. – 1984. – №12. – С. 63 – 76.
3. Морозов В.Г., Хавинсон В.Х., Малинин В.В. Пептидные тимомиметики. – СПб. – Наука. – 2000. – 158 с.
4. Потапнев М.П., Борткевич Л.Г., Печковский Д.В. и др. Методические рекомендации по экспериментальному (доклиническому) испытанию иммуномодулирующего действия фармакологических средств / Минск. – 1999. – С. 32.
5. Хавинсон В.Х., Анисимов В.Н., Заварзина Н.Ю. Влияние вилона на показатели биологического возраста и продолжительность жизни мышей // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2000. – Т.130. – №7. – С. 88-91.
6. Хайтов Р.М., Пинегин Б.В., Андропова Т.М. Отечественные иммунотропные лекарственные средства последнего поколения и стратегия их применения // Лечащий врач. – N 4. – 1998. – С. 46 – 51.
7. Шатаева Л.К., Хавинсон В.Х., Ряднова И.Ю. Пептидная саморегуляция живых систем (факты и гипотезы). – СПб. – Наука. – 2003. – 222 с.
8. Ярилин А.А. Основы иммунологии. – М. – 1999. – 608 с.
9. Cunningham A.G. A method of increasing sensitivity for detecting single antibody – forming cells // Nature. – 1965. – Vol. 207. – P. 1106 – 1107