

ИММУНОПРОТЕКТИВНЫЕ СВОЙСТВА НОВОГО ГИПОТАЛАМИЧЕСКОГО ПОЛИПЕПТИДА ПРИ БАКТЕРИАЛЬНЫХ ПАТОЛОГИЯХ

В.С.Априкян, А.А.Галоян

*/Институт биохимии им. Г.Х. Бунятыана НАН РА/
375014 Ереван, ул. П. Севака, 5/1*

Ключевые слова: гипоталамические полипептиды, мыши, бактериальные инфекции, протективные свойства, антитела, макрофаги, интерлейкин-1

Нейроиммуномодуляция составляет один из главных разделов современной нейроиммунологии [23]. Основным направлением исследований в данной области является изучение участия нейрогенных структур ЦНС в осуществлении функций иммунной системы в норме и при патологиях [17]. Впервые А.А.Галояном были обнаружены [10] и на протяжении ряда лет изучаются нейропептиды гипоталамуса [11]. Выделены и охарактеризованы отдельные гипоталамические полипептиды (ГП), обладающие выраженной биорегуляторной активностью [12]. Изучаются их иммунорегуляторные свойства. В частности, показано их участие в реакциях гуморального [4,7] и клеточно-опосредованного [9] иммунного ответа на различные антигены (АГ). Выявлена их способность повышать фагоцитарную [15], антигенпредставляющую [5] функции макрофагов (МФ), выработку цитокинов: интерлейкина-1 [6], интерлейкина-2 [5], интерлейкина-6 и фактора некроза опухолей- α [9]. Актуальным и практически значимым представлялось исследование защитной активности ГП в условиях развития инфекционных процессов бактериальной природы в организме.

Целью настоящего исследования явилось изучение протективных свойств одного из структурально охарактеризованных ГП: пролин-богатого полипептида [12] при наиболее распространенных бактериальных патологиях на мышиных моделях.

Материал и методы

В исследовании использовали беспатогенных мышей-гибридов первого поколения (СВАхС57BL/61)-1, самок 6–8-недельного возраста из питомника "Столбовая" РАМН. Мышей предварительно проверяли на

специфическое бактерионосительство. С этой целью из органов выборочно умерщвленных мышей делали мазки-отпечатки на дифференциальные питательные среды. Для моделирования инфекционных патологий мышей инфицировали 18 ч культурами патогенных штаммов микроорганизмов: *Salmonella typhimurium*, *Salmonella cholerae suis*, *Salmonella typhi*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Shigella flexneri*, *Shigella sonnei*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae* в логарифмической фазе роста, культивированных в стандартных условиях. Все штаммы были высоковирулентны и типичны по культуральным, морфологическим и ферментативным свойствам. ЛД₅₀ инъецированных бактериальных взвесей определяли по Kerber [22]. Выживаемость мышей выражали в процентах выживших животных от общего их количества в опытных и контрольных группах [14]. Постановку серологических реакций осуществляли на примере сальмонеллезной инфекции. Высоту АГ-специфического иммунного ответа оценивали по количеству анти-О-АТ к О-АГ сальмонелл в сыворотках крови инфицированных мышей в реакции пассивной гемагглютинации [19] с использованием эритроцитарного формализированного ультразвукового О-диагностикума [1]. Титр АТ выражали в log₂. Выделение гемокультуры проводили по Kauffmann [21]. Для типирования возбудителей проводили анализ монорецепторного аппарата микроорганизмов на предметных стеклах с применением агглютинирующих монорецепторных сывороток в неразведенном виде [13]. Для определения степени обсемененности микроорганизмами внутренних органов мышей в различные сроки после заражения их умерщвляли, асептически извлекали кровь, печень, селезенку, 12-перстную кишку, лимфатические узлы брыжейки, тонкий и толстый отделы кишечника, которые гомогенизировали в холодном растворе фосфатного буфера. По 100 мкл гомогенатов высевали на дифференциальные питательные среды Плоскирева и Эндо. Через 18 ч культивирования при 37°C производили подсчет колоний жизнеспособных микроорганизмов и пересчитывали на 1,0 мл суспензии из органа. Результаты выражали как log₁₀x4. Результаты высевок оценивали как по количественным показателям, так и по интенсивности обсемененности.

Использовали МФ, полученные методом перитонеального лаважа [2], которые извлекали на льду в 5,0 мл холодного раствора питательной среды RPMI 1640 (ICN, USA) в силиконизированные пробирки, центрифугировали 4 мин при 4°C и 110g, суспендировали по 1×10^6 /мл в 48 луночных микропланшетах Linbro (ICN, USA). Идентификацию МФ проводили цитохимически по активности α -нафтилацетатэстеразы [27] и морфологически [3].

Влияние ГП на бактерицидную активность МФ исследовали прямым методом бактерицидной активности по внутриклеточному киллингу бактерий *in vitro* после фагоцитоза *in vivo* [8] в модификации; 1,0 мл суспензии живых сальмонелл в сублетальной дозе (10^2) в 0,1% желатиновом растворе Хенкса (Gr. Isl., USA), содержащем 10,0% сыворотки новорож-

денного теленка (Gr. Isl., USA), инъецировали внутрибрюшинно (в/б) мышам. Через 3 мин мышей умерщвляли и лаважировали перитонеальные МФ (ПМФ). Для удаления внутриклеточных бактерий суспензии трижды промывали холодным желатиновым раствором Хенкса, центрифугировали и суспендировали по 6×10^6 ПМФ/мл. Содержание бактерии ПМФ реинкубировали при 37°C и в различные временные сроки определяли количество жизнеспособных внутриклеточных бактерий микробиологически, как описано выше. ГП инъецировали за 1 ч до заражения мышей. ГП получали из фракции низкомолекулярных белков и пептидов гипоталамуса крупного рогатого скота [10]. Этиотропное действие ГП оценивали как непосредственное их влияние на рост микроорганизмов в культурах *in vitro*.

Статистическую обработку полученных данных проводили с помощью t-критерия Стьюдента.

Результаты и обсуждение

На начальном этапе исследования возникла необходимость изучить прямое влияние ГП на микроорганизмы. С этой целью была исследована способность ГП изменять рост бактерий в культурах *in vitro*. Исследование показало, что ГП не обладали этиотропным действием — не изменяли качественные и количественные показатели роста микроорганизмов.

Установлено, что в иммунной защите микроорганизма при бактериальных патологиях главенствующая роль принадлежит МФ [20]. Общеизвестно, что только тот АГ, который будет захвачен и переработан МФ, способен вызвать иммунный ответ [20,24]. Показано, что преобладающая форма иммунного ответа вплоть до 4-х суток после заражения сальмонеллезной инфекцией опосредована МФ [16]. Экспериментально выявлено, что иммунологически активированные МФ способны элиминировать до 99% бактерий *S. typhimurium* в первые часы после их введения в организм [18]. Учитывая обнаруженные нами ранее свойства ГП активировать МФ [15], представлялось важным изучение их бактерицидных свойств. В нашем исследовании ГП, инъецированные в дозе 10^{-8} г/мышь за 1 ч до заражения мышей *S. typhimurium* в сублетальной дозе, повышали внутриклеточный киллинг бактерий ПМФ-ми в 1,45–2,5 раза ($p < 0,001$) при всех сроках наблюдения (табл. 1). Так, ГП повышали бактерицидную активность МФ на 30-, 60-, 90-, 120-, 180-й мин исследования соответственно в 2,5; 1,8; 1,51; 1,49; 1,45 раза.

Известно, что интенсивность развития и в значительной мере исход инфекционного процесса зависят от времени пребывания возбудителей в макроорганизме — сроков их персистенции и степени обсемененности внутренних органов пораженных животных [25]. Влияние ГП на процесс обсемененности органов животных изучали на примере сальмонеллезной инфекции. ГП инъецировали мышам в/б в дозе 10^{-8} г/мышь за 24 ч до их заражения *S. typhimurium* в летальных дозах. Результаты оценивали на 0-,

5-, 10-, 21-й дни наблюдения. Исследование выявило, что ГП способствовали значительному снижению обсемененности внутренних органов мышей: крови — в 4,02 раза, печени — в 1,97–2,34, селезенки — в 4,04–2,02, 12-перстной кишки — в 2,05–1,57, лимфатических узлов брыжейки — в 2,32–2,74, тонкого отдела кишечника — в 3,4–2,16, толстого отдела кишечника — в 1,41–1,8 ($p < 0,001$) раза соответственно на 5- и 10-й дни наблюдения. ГП также способствовали сокращению сроков персистенции возбудителей в организме животных, о чем свидетельствует полное их отсутствие в крови на 10-й день и в остальных органах — на 21-й день наблюдения (табл. 2).

Таблица 1

Влияние ГП на внутриклеточный киллинг *Salmonella typhimurium* ПМФ-ми мышей *in vitro* после фагоцитоза *in vivo*

Стимуляторы	Внутриклеточный киллинг бактерий (%) ПМФ-ми в различные сроки их инкубации (мин)				
	30	60	90	120	180
Контроль (без ГП)	24,6±3,1	51,3±4,6	62,2±5,2	66,1±5,4	68,2±5,6
ГП (10^{-8} г/мышь)	61,3±4,6	92,3±8,2	94,2±8,4	98,4±8,6	98,9±8,4

Известно, что инфицирование макроорганизма приводит к накоплению в сыворотке крови АТ и АГ этих возбудителей. Специфические АТ, образующиеся в результате гуморального иммунного ответа, связываются с поверхностью бактерий и в присутствии комплемента вызывают цитотоксическую реакцию — бактериолиз. АТ могут усиливать фагоцитарную активность МФ. Хорошо известна роль таких АТ-опсоинов при инфекционных патологиях [26]. В то же время АТ сами приобретают защитную способность после адсорбции на поверхности МФ [28]. В нашем исследовании ГП, инъецированные однократно в/б в дозе 10^{-8} г/мышь одновременно с бактериями *S. typhimurium* в сублетальных дозах, способствовали повышению выработки противосальмонеллезных АТ в 1,48–2,17 ($p < 0,001$) раза (табл. 3). Так, титры АТ на 5-, 10- и 21-е сутки наблюдения повышались соответственно в 2,17; 1,48 и в 1,84 раза. Наивысшая стимуляция продукции антибактериальных АТ под влиянием ГП имела место на пике индуктивного периода иммунного ответа — на 5-е сутки наблюдения. Однако интересно, что и на 21-е сутки наблюдения титры АТ у животных под действием ГП оставались в 1,84 раза выше таковых у контрольных, не обработанных ГП мышей. Данный факт свидетельствует о выраженной иммунорегуляторной эффективности ГП.

Таблица 2

Влияние ГП на процесс обсемененности *Salmonella typhimurium* внутренних органов мышей

Органы	Количество живых бактерий на орган ($\log_{10} \times 4$)					
	5-й день		10-й день		21-й день	
	Контроль	ГП	Контроль	ГП	Контроль	ГП
Кровь	2,25±0,04	0,56±0,008	0,53±0,007	0	0	0
Печень	2,58±0,05	1,31±0,03	2,27±0,04	0,97±0,01	0,69±0,01	0
Селезенка	2,18±0,03	0,54±0,01	1,03±0,02	0,51±0,01	0	0
12-перстная кишка	2,26±0,04	1,1±0,02	0,96±0,01	0,61±0,01	0,67±0,01	0
Лимфатические узлы брыжейки	2,27±0,04	0,98±0,01	2,58±0,05	0,94±0,01	1,29±0,02	0
Тонкий отдел кишечника	2,28±0,04	0,67±0,01	1,34±0,02	0,62±0,01	0,64±0,01	0
Толстый отдел кишечника	2,29±0,05	1,62±0,03	1,66±0,02	0,92±0,01	0,98±0,02	0

Таблица 3

Влияние ГП на продукцию противосальмонеллезных АТ в крови инфицированных мышей

Стимуляторы	Дни исследований	Титры анти-О-АТ ($\log_2$)		Коэф. стимуляции
		Контроль (без ГП)	ГП	
<i>Salmonella typhimurium</i>	0	0	0	—
	5	1,82±0,2	3,95±0,3	2,17
	10	1,65±0,1	2,44±0,16	1,48
	21	1,16±0,1	2,14±0,13	1,84

Следствием выявленных эффектов ГП явилась их способность повышать выживаемость животных, инфицированных различными микроорганизмами в летальных дозах. ГП в значительной мере: в 1,64–3,8 ($p < 0,001$) раза повышали выживаемость инфицированных животных, предохраняя их от гибели (табл. 4). Так, под действием однократной инъекции ГП в дозе 10^{-8} г/мышь за 24 ч до заражения животных 1–2 ЛД₅₀ выживаемость повышалась в 2,44 раза — при *S. typhimurium*, в 2,03 — при *S. cholerae suis*, в 2,21 — при *S. typhi*, в 2,18 — при *E. coli*, в 3,8 — при *Ps. aeruginosa*, в 1,73 — при *Sh. flexneri*, в 1,64 — при *Sh. sonnei*, в 2,02 — при *St. aureus*, в 2,17 — при *Str. pneumoniae*.

Влияние ГП на выживаемость мышей, зараженных различными бактериальными инфекциями в летальных дозах

Возбудители	Выживаемость мышей (%), инфицированных 1-2 ЛД ₅₀ и ЛД ₁₀₀	
	обработанные ГП	контрольные (без ГП)
<i>Salmonella typhimurium</i>	78,6±1,8	32,2±2,2
<i>Salmonella typhimurium</i>	12,5±0,5	0
<i>Salmonella typhimurium</i>	25,0±2,6	0
<i>Salmonella cholerae suis</i>	70,0±2,0	34,4±2,3
<i>Salmonella typhi</i>	58,2±1,3	26,3±1,3
<i>Escherichia coli</i>	62,4±2,1	28,6±1,4
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	88,2±1,9	23,2±1,2
<i>Shigella flexneri</i>	44,4±1,4	25,6±1,4
<i>Shigella sonnei</i>	36,4±1,5	22,2±1,2
<i>Staphylococcus aureus</i>	43,5±1,5	21,5±0,5
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	20,0±2,0	9,2±0,6

Интересно отметить, что даже при абсолютной летальной дозе (ЛД₁₀₀) при 100% гибели контрольных животных ГП предохраняли от гибели 12,5% животных при инъектировании за 24 ч до заражения и 25% животных — при их введении за 14 дней до заражения. Данный факт свидетельствует о способности ГП проявлять протективные свойства посредством специфических иммунных механизмов, что является основанием для их возможного использования в качестве средств, повышающих эффективность вакцинаций.

Таким образом, в процессе настоящего исследования обнаружены и охарактеризованы протективные свойства ГП при различных патологических состояниях бактериальной этиологии у мышей. Нами установлено, что ГП, введенные в организм животных до их экспериментального заражения патогенными бактериальными агентами в летальных дозах, обладают выраженными протективными свойствами: они способны предотвращать заболевание и приводить к полному выздоровлению животных при инфицировании летальными дозами бактерий. Протективный эффект ГП проявлялся у мышей при инфекционных патологиях, вызванных наиболее часто встречающимися микроорганизмами — возбудителями патогенных, условно-патогенных и госпитальных гнойно-септических инфекций. Данные возбудители были выбраны и в связи со сходством их этиологических и патогенетических характеристик.

Протективное действие ГП сопровождается стимуляцией выработки противомикробных АТ, повышением бактерицидной активности МФ по-

средством внутриклеточного киллинга бактерий, снижением обсемененности микроорганизмами внутренних органов зараженных животных и сокращением сроков персистенции возбудителей в инфицированных организмах. Выраженный защитный эффект при введении ГП до заражения животных бактериальными агентами в летальных дозах на различных моделях инфекций указывает на возможность их использования в качестве самостоятельного профилактического средства при инфекционных патологиях бактериальной этиологии в практической медицине.

Поступила 14.01.99

ՀԻՊՈԹԱԼԱՄՈՒՍԱՅԻՆ ՆՈՐ ՊՈԼԻՊԵՊՏԻԴԻ ԻՄՈՒՆՈՊՐՈՏԵԿՏՊՈՒՅԻՆ ՀԱՏԿՈՒԹՅՈՒՆՆԵՐԸ ԲԱԿԿԵՐԻԱԼ ԱՆՏԱԲԱԵՆՈՒԹՅՈՒՆՆԵՐԻ ԳԵՊՐՈՒՄ

Վ.Ս.Ապրիկյան, Ա.Ա.Գալոյան

Հետազոտվել են հիպոթալամուսային պրոլինով հարուստ նոր պոլիպեպտիդի /ՀՊ/ իմունապաշտպանիչ հատկությունները լարորատոր մկների մոտ զանազան բակտերիալ ախտաբանությունների մոդելներում:

Հայտնաբերվել է, որ ՀՊ ներարկումը կենդանիներին մինչև նրանց վարակելը բակտերիաների մահացու դոզաներով, ունի ցայտուն արտահայտված պաշտպանիչ ազդեցություն: ՀՊ կանխում է կենդանիների մոտ հիվանդության զարգացումը ու լիակատար առողջացման բերում սովորաբար մահացու բակտերիալ ինֆեկցիաների դեպքում: ՀՊ պաշտպանիչ էֆեկտը ուղեկցվում է արյան մեջ հակամիկրոբային հակամարմինների արտադրման խթանմամբ, մակրոֆագների բակտերիասպան ակտիվության ավելացմամբ՝ բակտերիաների ներթցջային քիլինգի միջոցով, վարակված կենդանիների ներքին օրգաններում բակտերիաների աճի նվազեցմամբ ու կենդանիների օրգանիզմում բակտերիաների գտնվելու ժամկետների կրճատմամբ:

Ստացված տվյալները ցույց են տալիս, որ ՀՊ կարող է օգտակար լինել պրակտիկ բժշկության մեջ բակտերիալ ախտաբանությունների դեպքում, իրեն ինքնուրույն կանխարգելիչ դեղամիջոց:

IMMUNOPROTECTIVE PROPERTIES OF NEW HYPOTHALAMIC POLYPEPTIDE IN BACTERIAL PATHOLOGIES

V.S.Aprikyan, A.A.Galoyan

The protective properties of a new hypothalamic proline-rich polypeptide (HP) in case of various bacterial models have been studied in mice.

It was established that HP injected to animals before their challenge with bacteria in lethal doses possesses a pronounced protective effect. HP protective action is accompanied by increase of the production of antimicrobial antibodies, bactericidal activity of macrophages by means of intracellular killing of bacteria, reduction of the bacterial growth in internal organs and the duration of the persistence of microorganisms in the body.

The results show that HP may be useful as a prophylactic remedy in infectious pathologies in practical medicine.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Априкян В.С., Сергеев Ю.О., Михайлова А.А. и др.* Иммунология, 1987, 6, с. 69.
2. *Априкян В.С., Михайлова А.А. Петров Р.В.* Иммунология, 1992, 2, с. 16.
3. *Априкян В.С., Михайлова А.А. Петров Р.В. Ж.* микробиол., эпидемиол., иммунобиол., 1992, 9-10, с. 71.
4. *Априкян В.С., Галоян К.А.* Нейрохимия, 1992, II, 2, с.212.
5. *Априкян В.С., Галоян К.А.* Нейрохимия, 1992, II, 3-4, с.27.
6. *Априкян В.С., Галоян К.А., Галоян А.А.* Нейрохимия, 1992, II, 3-4, с.34.
7. *Априкян В.С., Галоян К.А.* Нейрохимия, 1995, 12, 3, с.14.
8. *Априкян В.С.* Дис. докт. М., 1996.
9. *Априкян В.С., Галоян К.А., Галоян А.А.* Нейрохимия, 1998, 15, 2, с.189.
10. *Галоян А.А.* Проблемы эндокринол. и гормонотерап. 1964, 3, с.111.
11. *Галоян А.А.* Мед.наука Армении НАН РА, 1995, 35, 1-2, с.130.
12. *Галоян А.А.* Нейрохимия, 1998, 15, 1, с.3.
13. Лаб. исследован. в ветеринарии. Бактер.инфекции., под ред. Б.И.Антонова. М., 1986.
14. *Петров Р.В., Априкян В.С., Сергеев Ю.О. и др. Ж.* микробиол., эпидемиол., иммунобиол., 1988, 5, с.62.
15. *Aprikyan V.S., Galoyan K.A., Galoyan A.A.* Neurochem. (RAS and NAS RA), 1998, 15, 1, p.80.
16. *Baskerville A., Dow C., Curran W.L., Hanna J.* Brit.J. Exp. Pathol., 1972, 53, p. 641.
17. *Blalock J.E.* Immunol. Today, 1994, 15, 11, p.504.
18. *Blanden R.V., Mackaness G.B., Collins F.M. J.* Exp.Med., 1966, 124, p.585
19. *Boyden S.V. J.*Exp.Med., 1951, 93, p. 107.
20. *Celada A., Nathan C.* Immunol.Today, 1994, 15, p.100.
21. *Kauffmann F.* Int.J. System. Bact., 1974, 24, p.385.
22. *Kerber G.* Arch.Exp.Path.Pharmak., 1931, Bd 162, p.480.
23. *Mehler M.F., Kessler J.A.* Trends Neurosci., 1997, 20, p. 357.
24. *Rollag H., Degre H.* Acta Pathol. Microbiol. Immun. Scand., 1982, 90, 6, p.389.
25. *Rook G.A.W.* Proc.Roy.Soc.Med., 1976, 69, p. 442.
26. *Skarnes R.C.* Humoral bactericidal systems. Stratton-New York, 1979.
27. *Sonne O., Pedersen K., Kudahl K., Fisker S.* Scand. J. Immunol., 1991, 33, p.231.
28. *Van Oss R.* Ann. Rev. Microbiol., 1978, 32, p. 19.