

Влияние группоспецифических полисахаридов животного происхождения на цитотоксическую активность естественных киллерных клеток крови человека

РНПЦ гематологии и трансфузиологии, РУП “МБИ” концерна “Белбиофарм”

В экспериментах *in vitro* показано, что используемые в разработке новых иммуномодулирующих лекарственных средств полисахариды А и В, выделяемые по оригинальной технологии из слизистых оболочек свиней и лошадей, соответственно, в диапазоне расчетных суточных терапевтических доз обладают костимулирующей способностью к усилению цитотоксической активности естественных киллерных клеток крови человека.

Ключевые слова: иммуномодулирующие фармсредства, группоспецифические (в системе АВ0) полисахариды животного происхождения, “Фруглюмин А”, “Фруглюмин В”, естественные киллерные клетки крови человека, цитотоксическая активность

,b>V.N. Gapanovich, S.I. Krivenko, N.I. Melnova, Z.V. Peshnyak, A.J. Startseva, G.N. Bychko

Effects of group-specific polysaccharides of animal origin on cytotoxic activity of human natural killer ceels

In this work was shown, that polysaccharides A and B, which are extracted from mucous membrane of pigs and horses by original technology, have co-stimulatory influence on NK cells cytotoxicity intensification when used in range of calculated daily therapeutic doses. Key words: immunomodulatory drugs, group-specific (AB0-system) polysaccharides of animal origin, “Fruglyumin A”, “Fruglyumin B”, human natural killer cells, cytotoxic activity.

Одно из важных мест в фармакотерапии многих заболеваний инфекционной и неинфекционной природы занимают лекарственные средства на основе полисахаридов микробного и животного происхождения. Связано это с их способност**Влияние группоспецифических полисахаридов животного происхождения на цитотоксическую активность естественных киллерных клеток крови человека** ью инициировать или направленно изменять сложные механизмы специфической и неспецифической иммунологической резистентности организма, в той или иной мере ослабленной при большинстве патологических состояний. Уже в первых исследованиях было установлено, что микробные полисахариды повышают иммуногенез, а также неспецифическую резистентность к инфекции, интоксикации и лучевым поражениям, оказывают положительное влияние на течение воспалительного процесса, усиливают регенерацию нервной и мышечной тканей, активируют гипофиз-адреналовую систему, повышают устойчивость клеточных мембран и т.д. Во многом благодаря этим работам нашли широкое применение в клинической иммунологии отечественные препараты пирогенал, продигиозан и др., используемые в терапии пневмоний, инфицированных ран, трофических язв кожи и других воспалительных процессов. Вместе с тем, микробные полисахариды даже в лечебных дозах проявляют

некоторые токсические свойства, могут оказывать пирогенное действие, что объясняет определенную настороженность врачей при их использовании.

В конце прошлого столетия возможность усиления активности факторов иммунологической устойчивости организма была показана в отношении ряда полисахаридов, продуцируемых в ходе микробиологического синтеза бактериями *Leuconostoc mesenteroides* (декстран) и *Aerobasidium pullulans* (пуллулан). Было установлено, что радиационно-химическая модификация этих биополимеров придает им свойства направленной стимуляции гуморального и клеточного звеньев иммунной системы, комплемента и интерферогенеза [1,3-5]. Однако, данные эффекты определялись как сопутствующие у лекарственных средств, предназначенных для коррекции гиповолемических расстройств и гипотензивных состояний, и до настоящего времени не реализованы в разработке иммуномодулирующих средств.

Среди полисахаридов животного происхождения особый интерес представляют соединения, выделяемые из слизистых оболочек свиней (полисахарид А, ПА) и лошадей (полисахарид В, ПВ), обладающие способностью проявлять группоспецифические свойства в отношении нейтрализации α - и β -изогемагглютининов в системе АВ0 крови человека, что уже само по себе предполагает наличие у них иммунологических свойств. Ранее было установлено, что эти вещества активируют факторы неспецифического иммунитета, в частности обладают высокой интерферогенной активностью при исследовании в культурах клеток фибробластов эмбриона человека, фибробластов эмбрионов кур и мышинных фибробластов [2].

Целью настоящего исследования, являющегося частью комплексных работ, направленных на создание иммуномодулирующих препаратов на основе ПА и ПВ, было изучение влияния группоспецифических полисахаридов еще на одно звено неспецифического иммунного ответа – цитотоксическую активность естественных киллерных клеток (ЕКК) крови человека.

Материал и методы

Оценку цитотоксической активности ЕКК проводили с использованием опухолевой линии эритромиелолейкоза человека К-652 в ЖАМ-тесте по методу Matzinger P. [7]. Мононуклеры периферической крови (МПК) человека (здоровые доноры) инкубировали в течение 4 часов в присутствии различных концентраций исследуемых полисахаридов и препарата сравнения – натрия нуклеината (НН, аналог ПА и ПВ по предполагаемым целевым иммуномодулирующим свойствам, РУП “Белмедпрепараты”) в среде RPMI-1640, содержащей 1% АВ-сыворотки. Одновременно готовили клетки-мишени, для чего опухолевые клетки однократно отмывали средой RPMI-1640 с 2% АВ-сыворотки, 10 ед/мл пенициллина и 100 мкг/мл стрептомицина, а затем ресуспендировали в полной питательной среде (RPMI-1640 с 10% АВ-сыворотки, 2 мМ/л L-глутамин, 10 ед/мл пенициллина и 100 мкг/мл стрептомицина) до концентрации 500 тыс/мл. К суспензии клеток добавляли (метил-3Н)-тимидин в концентрации 2,5-5 μ Ci/мл и инкубировали 4 часа при 37°C во влажной атмосфере с 5% CO₂, после чего трижды отмывали и в конечной концентрации 100 тыс./мл в среде для анализа (минимальная среда RPMI-1640 с 5% АВ-сыворотки, 10 ед/мл пенициллина и 100 мкг/мл стрептомицина, 2 мМ/л L-глутамин) вносили в объеме 100 мкл на лунку 96-луночной круглодонной культуральной планшеты и инкубировали с клетками-эффекторами в течение 18 часов при 37°C в атмосфере с 5% CO₂.

После окончания инкубации с клетками-эффекторами клеточная смесь с помощью харвестера переносилась на фильтры, которые последовательно промывались 9% раствором натрия хлорида, 5% раствором трихлоруксусной кислоты и 80% этанолом. Фильтры высушивались при 37° С или при комнатной температуре и переносились в стинтилляционные флаконы с 4 мл стинтилляционной жидкости ЖС-1 (толуол, содержащий 1г/л РРО и 0,1 г/л РОРОР для определения радиоактивности на бетта-счетчике).

Величину цитотоксической активности (ЦТА) ЕКК рассчитывали в процентах по формуле:

$$\text{ЦТА} = (C - Э) * 100/C,$$

где С – спонтанная радиоактивность в контрольных пробах (клетки-мишени без клеток-эффекторов), Э – радиоактивность в опытных пробах (клетки-мишени с клетками-эффекторами).

В экспериментах были использованы постановки с соотношением клеток эффекторов/мишеней – 20:1 и 40:1. Конечные концентрации в культуре ПА, ПВ и НН соответствовали интервалу среднесуточных терапевтических доз (0,5; 1; 2,5 и 5 мг/мл). Все варианты постановок осуществлялись в триплетах.

Результаты и обсуждение

Анализ полученных результатов свидетельствует о том, что ЦТА ЕКК крови здоровых лиц при соотношении клеток эффекторов/мишеней 20:1 составила 27,1±6,7%. Предварительная инкубация МПК с ПА, ПВ, а также НН в целом вызывала усиление ЦТА во всем диапазоне исследуемых концентраций (0,5-5 мг/мл), с максимумом проявляемого эффекта для группоспецифического полисахарида А в концентрациях 1 мг/мл и 5 мг/мл, для группоспецифического полисахарида В и натрия нуклеината – 1-5 мг/мл. При этом для биополимера, выделенного из слизистых оболочек лошадей, выраженность ЦТА для доз 2,5 мг/мл и 5 мг/мл приобретала характер статистически значимой зависимости, превышая аналогичный эффект препарата сравнения, что было характерно и для концентрации 1 мг/мл, близкой к терапевтической дозе (таблица 1).

Таблица 1

Влияние группоспецифических полисахаридов А и В на цитотоксическую активность естественных клеток-киллеров крови здоровых доноров (соотношение клеток эффекторов/мишеней – 20:1)

Исследуемый препарат	ЦТА, %				
	0 мг/мл (контроль n=5)	0,5 мг/мл (n=5)	1 мг/мл (n=5)	2,5 мг/мл (n=5)	5 мг/мл (n=5)
Полисахарид А		35,6±6,7	37,1±6,9	28,7±7,3	38,2±9,6
Полисахарид В	27,1±6,7	39,4±5,0	46,1±5,6	45,8±4,0*	46,8±4,5*
Натрия нуклеинат		32,7±9,7	44,5±4,0	36,3±4,5	43,8±9,8

Примечание. * – достоверность отличий по отношению к контролю при уровне значимости P < 0,05.

При соотношении клеток эффекторов/мишеней 40:1 спонтанная цитотоксическая активность возросла почти вдвое, составив 55,4%, что демонстрировало адекватность выбранной модельной постановки. Однако в этих условиях костимулирующее

действие всех исследуемых препаратов в усилении ЦТА ЕКК по отношению к клеткам-мишеням опухолевой линии эритромиелоза человека К-652 проявлялось в меньшей степени, регистрируясь на уровне тенденции, более свойственной для ПВ и НН (табл. 2).

Анализируя полученные данные необходимо учитывать то обстоятельство, что доля ЕКК, способных лизировать определенные клетки-мишени без предварительного контакта и последующего распознавания (т.е. абсолютно неспецифически), в общем пуле клеток, лишенных маркеров Т- и В-лимфоцитов, достаточно велика. Их содержание в крови составляет до 20% от общего числа лимфоцитов, в печени – 42%, селезенке – 36%, в лимфатических узлах – 3%, легких – 5%, костном мозге – 2%. К тому же, нормальные клетки менее подвержены литическому действию ЕКК, чем опухолевые. ЕКК играют важную роль в обеспечении естественного иммунитета к микробным инфекциям, регуляции гемопоэза, формировании толерантности организма к трансплантатам, их считают первичным барьером для вирусных инфекций и др. ?6?.

Таблица 2

Влияние группоспецифических полисахаридов А и В на цитотоксическую активность естественных клеток-киллеров крови здоровых доноров (соотношение клеток эффекторов/мишеней – 40:1)

Исследуемый препарат	ЦТА, %				
	0 мг/мл (контроль n=5)	0,5 мг/мл (n=5)	1 мг/мл (n=5)	2,5 мг/мл (n=5)	5 мг/мл (n=5)
Полисахарид А		60,4±5,3	55,3±5,3	49,8±1,4	56,8±0,4
Полисахарид В	55,4±3,5	64,8±2,2	57,8±0,2	55,2±2,1	54,4±3,9
Натрия нуклеинат		64,5±3,2	60,0±1,3	60,2±3,7	68,5±1,7

Поэтому установление у группоспецифических полисахаридов А и В, получаемых соответственно из слизистых оболочек желудка свиней и лошадей, костимулирующей способности к усилению цитотоксической активности ЕКК крови человека, не уступающей таковой у официально выпускаемого иммуномодулирующего препарата натрия нуклеинат, может служить основанием для предположения наличия подобных свойств и у лекарственных средств, создаваемых на их основе.

Литература

1. Вознюк А.В., Потапнев М.П., Гапанович В.Н. и др. Усиление продукции антител и антибактериальной функции нейтрофилов под действием неорондекса // Респ. научн.-практ. конф. “Совершенствование трансфузиологического обеспечения в Республике Беларусь. Разработка, экспериментальное изучение и клиническое применение препарата неорондекс” / Тез. докл., Могилев, 24-27 мая 1994 г. – Могилев, 1994. – С. 15-18.

2. Горецкая И.С., Давыдов О.В., Гапанович В.Н. и др. Изучение интерферогенной активности препаратов полисахаридной природы в культуре клеток // Тез. докл. Межд. научн. конф. “Новые лекарственные средства: синтез, технология, фармакология, клиника”. Минск, 14-16 ноября 2001 г. – Минск, 2001. – С. 34-35.

3. Горецкая И.С., Давыдов О.В., Петров П.Т. и др. Изучение в культурах клеток интерфероногенных свойств неорондекса // Т а м же, С. 53-56.
4. Горецкая И.С., Давыдов О.В., Петров П.Т. и др. Полисахариды, содержащие металлокомплексы – индукторы интерферона // Т а м же, С. 62-63.
5. Кривенко С.И., Кушнерова Г.И., Гапанович В.Н. и др. Влияние нового кровезаменителя на основе полисахарида пуллулана на пролиферативную активность кроветворных предшественников костного мозга человека и мыши *in vitro* // Тез. докл. Междунар. научн. конф. “Лекарственные препараты на основе модифицированных полисахаридов”. – Минск, 1998. – С. 39-41.
6. Савин А.В., Манько В.М. Неспецифический иммунитет / Гематология и трансфузиология. – 1993. – № 4. – С. 11-15.
7. Matzinger P. The JAM test: a simple assay for DNA fragmentation and cell death / J. Immunol. Methods. – 1991. – Vol. 145. – P. 185-187.