

ИЗУЧЕНИЕ ВЛИЯНИЯ НОВОЙ ФАРМАКОЛОГИЧЕСКОЙ КОМПОЗИЦИИ НА КЛЕТКИ КРОВИ

В результате проведенных исследований *in vitro* установлено отсутствие прямого цитотоксического воздействия новой фармакологической композиции, полученной из тромбоцитов человека, на клетки крови мышей

Актуальность. В последние годы выясняется, что среди многочисленных факторов врожденного иммунитета в защите организма млекопитающих важное место занимают катионные ПМП (дефенсины, кателицидины и другие), которые являются многофункциональными молекулами, способными непосредственно подавлять рост патогенов, участвовать во врожденном и приобретенном иммунном ответе (первая линия противомикробной защиты, «немедленный иммунитет», иммунорегуляция), действуя как эндогенные, природные антибиотики и как сигнальные молекулы, вовлекаемые в активацию иммунных клеток и репарацию (1, 2).

Особое внимание привлекают ПМП с положительным поверхностным зарядом – катионные ПМП, и среди них преобладают пептиды, обозначаемые как дефенсины. Дефенсины получили свое название от англ. *defense* (защита), что отражает их основную способность – обеспечивать защиту организма от патогенных микроорганизмов.

Положительно заряженные дефенсины электростатически соединяются с отрицательно заряженной мембраной патогенов и при определенном градиенте насыщенности формируют мультимерные поры, что приводит к гибели микроорганизмов (3). К ним значительно реже формируется резистентность патогенных штаммов микроорганизмов, поэтому катионные противомикробные пептиды также обозначаются как природные (естественные) антибиотики. Дефенсины, помимо противомикробной активности обладают мощным регуляторным действием на клетки иммунной системы в качестве хемотаксических факторов для моноцитов, Нф, Т-лимфоцитов, индукторов выработки провоспалительных цитокинов, индукторов освобождения гистамина и простагландинов тучными клетками; стимулируют клетки эпителия слизистых к выработке цитокинов (4).

Благодаря вышеперечисленным свойствам эндогенные катионные пептиды нашли широкое применение при лечении многочисленных заболеваний (5, 6). При этом в последнее время в иностранной печати встречаются работы с описанием противоопухолевого воздействия, оказываемого катионными низкомолекулярными пептидами за счет повышения проницаемости мембран опухолевых клеток с последующей их гибелью (7, 8).

Известно также, что помимо нейтрофилов, клеток эпителиального происхождения, способностью к выработке катионных пептидов обладают и тромбоциты. Так, установлено, что в тромбоцитах человека содержатся пептиды, обладающие антимикробной активностью (9, 10). Имеются сведения об использовании пептидов, выделенных из тромбоцитов кролика, и их производных для лечения инфекционных заболеваний (11).

Исходя из этих данных, целью нашей работы стало выяснение наличия цитотоксических эффектов у эндогенных пептидов, выделенных из тромбоцитов человека – тромбодифенсинов и входящих в состав фармакологической композиции, на примере воздействия на клетки лейкоцитарного ряда *in vitro*. Данная композиция получена путем замораживания и размораживания тромбоцитарной массы при температуре – от +15 до -20°C в течение 24 часов, центрифугирования, фильтрации супернатанта через диализные мембраны и элюции концентрата, содержащего пептиды, линейным градиентом ацетонитрила с Сефадекса G-50. Полученные пептидные фракции собрали, объединили и определили общее содержание белка, которое составило 146 мкг/мл, а затем лиофилизировали (12).

Материалы и методы

В ходе пилотных исследований предполагалась оценка цитотоксического эффекта исследуемой фармакологической композиции по

отношению к лейкоцитам крови лабораторных животных *in vitro*. С этой целью было отобрано по принципу пар-аналогов 15 голов мышей самцов оригинальной линии BLRB (8.17) 1Lem, которые характеризуются высокой частотой возникновения спонтанного рака молочных желез (РМЖ) с возможным участием экзогенного ММТВ-ретровируса, обнаруженного у них в лейкоцитарной фракции, у каждого из которых было взято по 2 мл крови из желудочка сердца (13). После стабилизации полученный объем крови был разделен на 2 части – по 1 мл в отдельные пробирки. Таким образом, от каждого подопытного животного было получено по два образца крови (по 1 мл), один из которых служил контролем, а во второй образец добавлялись исследуемые пептиды в 5 различных концентрациях: 1 – 9,7 (разведение 1:15); 2 – 1,46 (1:100); 3 – 0,15 (1:1000); 4 – 0,03 (1:5000) и 5 – 0,02 мкг/мл (1:10000). При этом исходная концентрация пептидов в изучаемой композиции составила 146 мкг/мл. Изменение концентрации тромбодифенсинов производилось путем разведения композиции раствором фосфатного буфера. В контрольные образцы при этом добавляли только фосфатный буфер. Соотношение крови и фосфатного буфера или исследуемой фармакологической композиции составило 2:1. Затем дважды, по истечении 2 и 12 часов, из всех образцов крови были изготовлены мазки, а также с помощью гематологического анализатора «Medonic Loke», СА-620 получены гемограммы. Приготовленные мазки крови

после фиксации окрасили по Романовскому – Гимза. Затем в них был произведен подсчет общего количества клеток лейкоцитарного ряда и их дифференциация из расчета на 100 клеток.

Результаты и их обсуждение

Результаты изменений показателей лейкограммы представлены на рис. 1 и 2.

Как видно из рис. 1 и 2, показатели процентного содержания лейкоцитов подверглись незначительным изменениям под воздействием исследуемой фармакологической композиции независимо от ее разведения и времени экспозиции, при этом практически не изменилось и их общее количественное содержание. Так, наблюдается увеличение содержания сегментоядерных нейтрофилов на 1-4% в зависимости от концентрации тромбодифенсинов в композиции при экспозиции - 2 часа, через 12 часов разница в данном показателе с контролем сокращается до 1-2%. Изменяется в сторону уменьшения и процентное содержание лимфоцитов – на 1-3%. Нарастает процентное содержание моноцитов в лейкограммах, полученных из образцов крови после 12-ти часового воздействия изучаемой композиции – на 1-3%. Вышеперечисленные изменения носят недостоверный характер.

Аналогичная картина наблюдается и в изменениях показателей гемограмм, то есть незначительное их увеличение или снижение было недостоверным (рис. 3, 4).

Так, максимальное снижение одного из показателей – концентрации тромбоцитов (PLT)

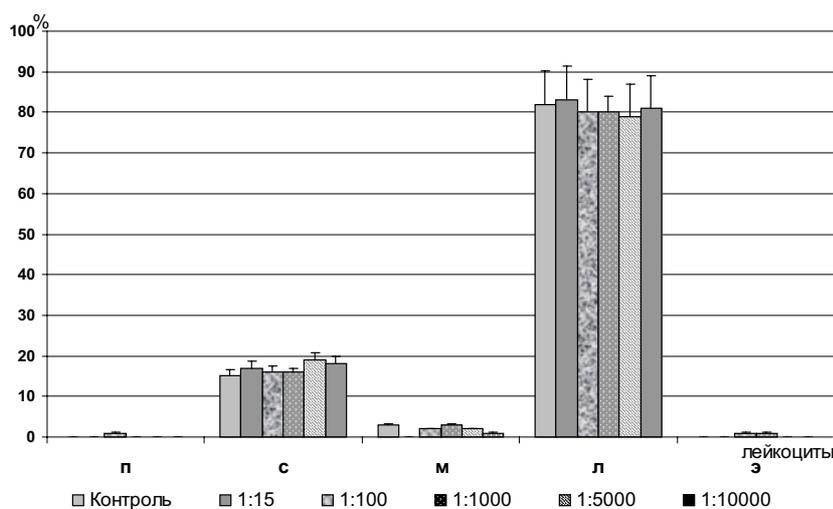


Рисунок 1. Изменение лейкограммы под воздействием различных концентраций тромбодифенсинов *in vitro* (экспозиция – 2 ч)

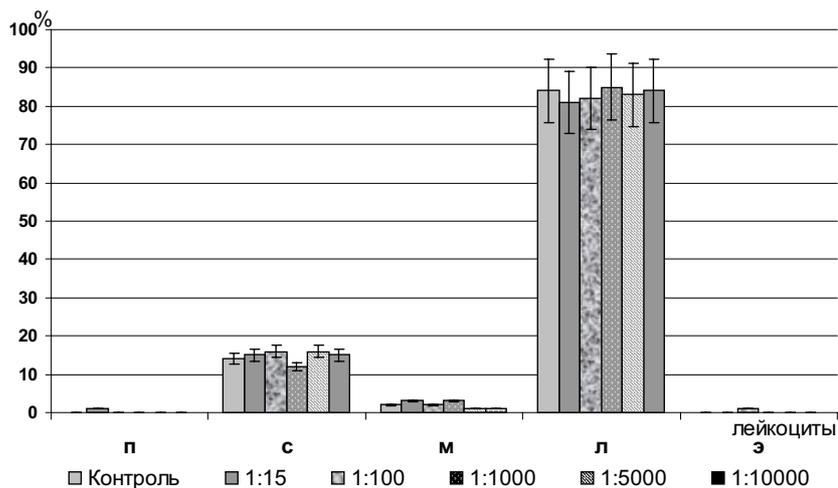


Рисунок 2. Изменение лейкограммы под воздействием различных концентраций тромбодензинов in vitro (экспозиция – 12 ч)

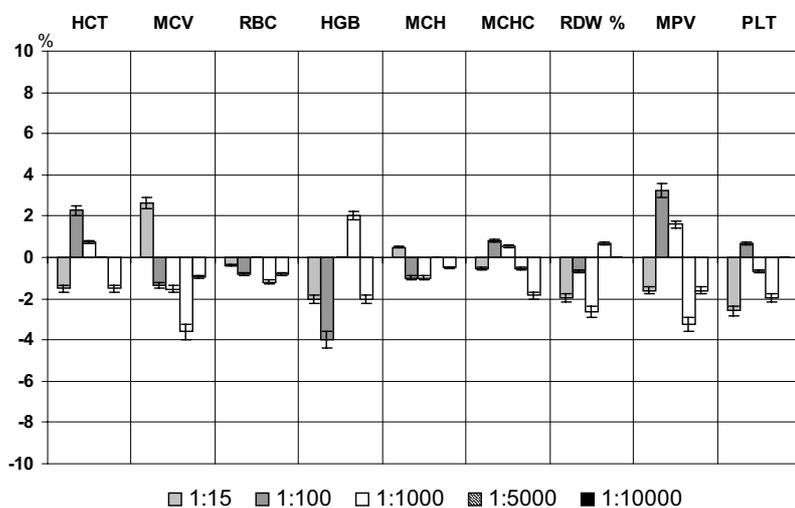


Рисунок 3. Изменение показателей гемограммы под воздействием различных концентраций тромбодензинов in vitro (экспозиция – 2 ч)

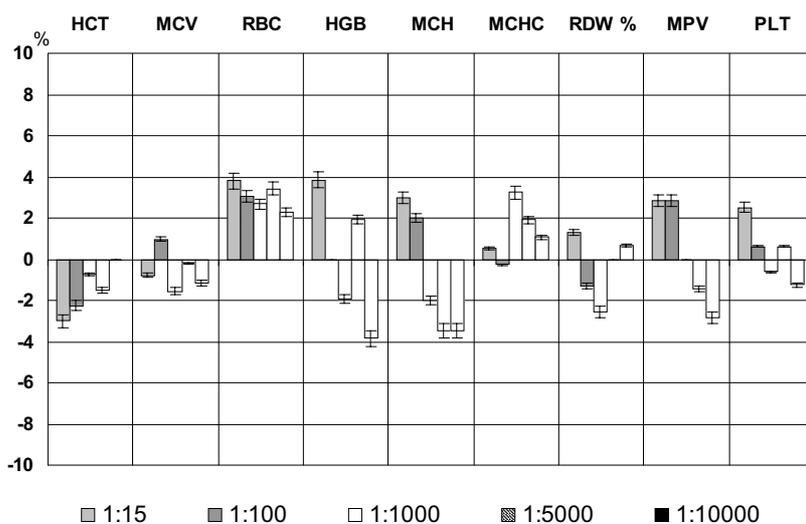


Рисунок 4. Изменение показателей гемограммы под воздействием различных концентраций тромбодензинов in vitro (экспозиция – 12 ч)

– на 2,6% наблюдается после 2-х часов экспозиции образца крови с композицией, имеющей концентрацию тромбодифензинов 9,7 мкг/мл. Наибольшее снижение концентрации гемоглобина (HGB) отмечено при концентрации пептидов 1,46 мкг/мл и экспозиции 2 часа, что на 6% было ниже уровня в контрольном образце. При этом максимальное снижение показателя средней концентрации гемоглобина в эритроците – на 1,9% наблюдалось при разведении исследуемой композиции 1:10 000, когда концентрация дефензинов составила всего 0,02 мкг/мл.

После 12-ти часов воздействия наибольшим изменениям подверглись следующие показатели: RDW – ширина разброса эритроцитов по диаметру; HGB – концентрация гемоглобина; RBC – концентрация эритроцитов. При этом колебания параметров не превышали 4% и были не достоверны.

Таким образом, исходя из полученных данных, можно судить об отсутствии прямого цитотоксического эффекта тромбодифензинов в составе композиции по отношению к клеткам крови мышей.

Список использованной литературы:

1. Boman H.G. Antibacterial peptides: basic facts and emerging concepts. *J. Internal Med.*, 2003, 254:197.
2. Lehrer R.I., Ganz T. Defensins of vertebrate animals. *Cur. Opin. Immunol.*, 2002, 14:96.
3. Кокряков В.Н. 1999. Биология антибиотиков животного происхождения. «Наука», Санкт-Петербург, 1999.
4. Yang D., Biragyn A., Kwak L.W., Oppenheim J. J. Mammalian defensins in immunity: more than just microbicidal. *Trends in Immunol.*, 2002, 23:291.
5. Cunliffe R.N. Defensins in the gastrointestinal tract. *Molec. Immunol.*, 2003, 40:463
6. Zasloff M. Antimicrobial peptides of multicellular organisms. *Nature*, 2002, 415:389.
7. McKeown S.T. et al. the cytotoxic effect of human peptide-1 (HNP1) and lactoferrin on oral squamous cell carcinoma (OSCC) in vitro. *Oral On-col.* 2006. Vol 42(7) P.685.
8. Johnstone S.A. et al. In vitro characterization of the anticancer activity of membrane-active cationic peptides. Peptid-mediated cytotoxicity and peptide-enhanced cytotoxic activity of doxorubicin against wild-type and glycoprotein overexpressing tumor cell lines. *Anticancer drug des.* 2000. Vol. 15(2). P.151
9. Tang Y.-Q., Yeaman M.R., Selsted M.E. Antimicrobial peptides from human platelet // *Infect. Immun.* – 2002. – Vol. 70. – P. 6524-6533.
10. Бухарин О.В., Черешнев В.А., Сулейманов К.Г. Антимикробный белок тромбоцитов. – Екатеринбург: УрО РАН, 2000. – С. 35-99.
11. US Patent 6743769 A 61 K 038/04, 2004.
12. Патент RU 2278675 C1 от 27.06.2006 «Антимикробное средство и фармацевтическая композиция, содержащая эффективное количество антимикробного средства».
13. Ekaterina V. Moiseeva. Original approaches to test anti-breast cancer drugs in a novel set of mouse models / [S.l.] : [s.n.], 2005 - Tekst. - Proefschrift Universiteit Utrecht.

Работа выполнена при поддержке Гранта РФФИ 08-04-99107 р_офи