Влияние протеина тимуса овец на функциональную активность эффекторов врожденного иммунитета

Effect of the sheep thymus protein on the functional activity of the effectors of innate immunity

Ездакова И.Ю.

Г.Москва

DOI CrossRef: 10.30917/ATT-VK-1814-9588-2018-6-7
УДК 619:616.937.5

Ключевые слова: тимус, иммунокомпетентные клетки, фагоцитарная активность, иммуноглобулины.

Key words: thymus, immunocompetent cells, phagocytic activity, immunoglobulins.

Резюме. При разработке новых вакцин часто возникают проблемы с недостаточной иммуногенностью микроорганизма, поэтому поиск препаратов, нацеленных на активацию эффекторов врожденного иммунитета, является перспективным направлением в области вакцинологии. Конструирование вакцин из иммуногенных эпитопов антигена должно сочетаться с использованием специфических молекул, в том числе белков, активирующих фагоциты, NK-клетки, CD5-B-клетки. Целью данной работы было изучение сочетанного влияния белка тимуса на функциональную активность фагоцитов и уровень иммуноглобулинов классов G и M в биологических жидкостях овец. В результате проведенных исследований установлено, что протеин T50 обладает способностью модулировать иммунную систему овец. Такая модуляция выражается в активации иммунной системы, а именно в увеличении количества эффекторов врожденной системы иммунитета и уровня иммуноглобулинов классов M и G в течение 14-ти суток после его введения животным.

Summary. When developing new vaccines, there are often problems with insufficient immunogenicity of the microorganism, so the search for drugs aimed at activating the effectors of innate immunity is a promising area in the field of vaccinology. The construction of vaccines from immunogenic antigen epitopes should be combined with the use of specific molecules, including proteins that activate phagocytes, NK cells, and CD5-B cells. The aim of this work was to study the combined effect of the thymus protein on the functional activity of phagocytes and the level of immunoglobulins of classes G and M in biological fluids of sheep. As a result of the conducted studies it was found that protein T50 has the ability to modulate the immune system of sheep. Such modulation is expressed in the activation of the immune system, namely, in the increase in the number of effectors of the innate immunity system and the level of

immunoglobulins of classes M and G within 14 days after its administration to animals.

Введение

В настоящее время в научных лабораториях получено множество пептидов и полипептидов тимуса различных видов животных [1,2]. Это тимозины (фракция 5 тимозина, Т-альфа-1, протимозин альфа, бета-тимозины и др.), тималин, тактивин, тимический гуморальный фактор, тимопоэтин, тимостимулин, тимический фактор X, тимомодулин, тималин, тимоген и др. Все выше перечисленные препараты представляют низкомолекулярные белки с молекулярной массой от 1 до 17 kDa, полученные, в основном, из тимуса крупного рогатого скота. Известно, что тимус является местом созревания и дифференцировки Т-лимфоцитов животных. Предшественники Т-клеток мигрируют из костного мозга в корковую зону тимуса, где дифференцируются в зрелые Т-лимфоциты, поступающие затем в периферические органы иммунной системы. У млекопитающих тимус состоит из двух долей, которые разделены на дольки, внутри которых тимоциты образуют три зоны: наружную субкапсулярную, среднюю – корковую и внутреннюю – мозговую (медуллярную). Основу структуры тимусных долек составляют эпителиальные клетки трех типов (кортикальные, медуллярные, nurse cells), влияющие на созревание Т-клеток посредством поверхностных и секретируемых молекул. Так, эпителиальные клетки тимуса продуцируют интерлейкин-7, который является основным цитокином для развития, дифференцировки и пролиферации тимоцитов. Интердигитальные дендритные клетки и макрофаги костномозгового происхождения, находящиеся в тимусе, также секретируют цитокины для созревания тимоцитов. Кортикальные и медуллярные тимоциты синтезируют и экспрессируют на своей поверхности CD-антигены (CD1 и CD27), которые, в основном, являются белками (М.м. 43-55 kDa), без которых невозможна активация Т-лимфоцитов.

Таким образом, в тимусе под действием пептидов и полипептидов, синтезируемых различными клетками тимуса, происходит "обучение" Т-клеток. И, соответственно, основной мишенью действия препаратов тимического происхождения, являются Т-клетки. Но поскольку иммунная система "работает" по принципу сообщающихся весов, действие таких препаратов вне зависимости от исходной направленности изменяет функциональную активность всей иммунной системы в целом, в том числе структурных компонентов врожденной системы. При разработке новых вакцин часто возникают проблемы с недостаточной иммуногенностью микроорганизма, поэтому поиск препаратов, нацеленных на активацию эффекторов врожденного иммунитета, является перспективным направлением в области вакцинологии. Конструирование вакцин из иммуногенных эпитопов антигена должно сочетаться с использованием специфических молекул, в том числе белков, активирующих фагоциты, NK-клетки, CD5-B-клетки. Известно, что действие препаратов, активирующих фагоцитарную активность клеток, сопровождается усилением реакций гуморального иммунитета [3,4]. Поэтому целью данной работы было изучение сочетанного влияния белка тимуса на функциональную активность фагоцитов и уровень иммуноглобулинов классов G и M в биологических жидкостях овец.

Материалы и методы исследований

Методика получения белка тимуса овец (T50) включа-

Авторы / Authors

Ездакова И.Ю., доктор биологических наук

Капустина О.В., доктор ветеринарных наук

Вальциферова С.В., кандидат биологических наук

ФГБНУ "Федеральный научный центр - Всероссийский научно-исследовательский институт экспериментальной ветеринарии имени К.И.Скрябина и Я.П.Коваленко РАН"

Ezdakova I.Yu., Kapustina O.V., Valtsiferova S.V.

ла: гомогенизацию тимуса, 3-кратное высаливание надосадочной жидкости сульфатом аммония при различных концентрациях, гель-фильтрацию на Sephadex G-100, иммуноэлектрофорез. Оценку степени чистоты и определение молекулярной массы проводили методом электрофореза в ПААГ-ДСН. В результате получен иммунохимически чистый протеин с молекулярной массой 50 kDa (T50). Опытной группе животных (5 овец в возрасте 5 лет – опытная база о. Лисий), вводили в/м T50, контрольной (n=5) – физиологический раствор. Исследования по определению количества клеток крови и их фагоцитарной активности с частицами латекса (1,1 μ) проводили по стандартным методикам [5]. Исследования проводили на 3-и, 7-е, 14-е сутки иммунного ответа.

Результаты исследований

В результате осаждения гомогенизата тимуса овцы сульфатом аммония была получена преимущественно белковая взвесь, состоящая из высокомолекулярной и низкомолекулярной группы компонентов. Так как целью работы было оценить свойства высокомолекулярных белков тимуса, в процессе элюции были отобраны фракции с концентрацией белка больше 0,6 мг/мл (280 nm), выходящие в первом пике элюата. Белковый спектр 3 фракций первого пика после концентрирования (ПЭГ-40000) в ПААГ-ДСН был представлен одной полосой, соответствующей стандартному маркеру массой 50 kDa. Таким образом, после 5 хроматографических циклов был получен протеин м.м. 50 kDa с концентрацией белка 4,4 мг/мл. Полученный тимус-специфический белок после диализа вводили овцам внутримышечно по 2 мл. В результате проведенных исследований установлено, что на седьмые сутки иммунного ответа незначительно увеличилась фагоцитарная активность, фагоцитарное число, количество нейтрофилов и моноцитов, концентрация IgM и достоверно повысилось содержание IgG в сыворотке крови опытных животных (таблица).

Известна роль низкомолекулярных (10kDa) препаратов тимусного происхождения в процессе регуляции дифференцировки и пролиферации тимоцитов [2]. В наших предыдущих опытах с препаратом, включавшим в себя тактивин, фагоцитарная активность клеток крови мышей достоверно возрастала на первые и седьмые сутки после введения [5]. В настоящей работе результаты свидетельствуют о том, что белок с большей молекулярной массой активирует фагоциты крови одновременно с В-лимфоцитами, синтезирующими тимус-специфические IgG.

Для фагоцитов характерны два основных функциональных состояния: исходное, с низким уровнем проявления физиологических процессов, и активированное, переход в которое обусловлен взаимодействием клеток с антигеном. Активация фагоцитов сопровождается морфологическими и биохимическими изменениями не только самих фагоцитов, но и клеток микроокружения. Первая стадия активации получившая название "прайминг", характеризуется тем, что при незначительной концентрации праймера не вызывает каких-либо существенных функциональных изменений и фагоцит может вернуться в исходное состояние. Однако, при достаточной концентрации вводимого препарата, происходит активация макрофагов, что ведет к запуску цепных иммунных реакций, что и произошло в нашем эксперименте. Однократное введение белка с концентрацией 4,4 мг/мл увеличило функциональную активность эффекторов врожденной системы иммунитета, что привело к активации структурных компонентов адаптивной системы иммунитета.

Повышенный уровень иммуноглобулина G сохранялся

Рис. Концентрация IgG и IgM в сыворотке крови овец при введении T50

и на 14-е сутки иммунного ответа в сыворотке крови опытных животных (рис.). Анализ полученных экспериментальных данных позволил сделать вывод о влиянии T50 как на специфическое звено иммунитета, так и на эффекторы врожденной системы. Однократное введение белка молекулярной массой 50 kDa было достаточно для развития иммунного ответа по классической схеме. Данный белок активировал реакции врожденного иммунитета, являющихся важнейшими для формирования адаптивного иммунитета. Именно активация этих процессов характеризует современные концепции в вакцинологии [3].

Тимус – место размножения и созревания Т-лимфоцитов. Предшественники Т-клеток мигрируют из костного мозга в корковую зону тимуса, где дифференцируются в зрелые Т-лимфоциты с помощью белков, синтезируемых различными клетками тимуса. Как показывают экспериментальные данные тимус-специфические белки не только участвуют в процессе созревания Т-клеток, но и обладают иммунорегуляторными функциями.

Иммунная система представляет собой совокупность лимфоидных органов и иммунокомпетентных клеток, которые находятся в постоянном взаимодействии со всеми системами организма посредством различных сигнальных молекул. Тимус выполняет ряд важных эндокринных и иммунных функций в организме. Гормоны и другие различные белки тимуса регулируют выработку и дифференцировку лимфоцитов. Они созревают, подвергаются отрицательной и положительной селекции в зависимости от их будущих функций под влиянием сигнальных молекул, секретируемых вилочковой железой. Гормоны, вырабатываемые железами внутренней секреции, стимулируют синтез белковых молекул в тимусе, которые выполняют регуляторные функции в процессе иммуногенеза. Полученный белок T50 с молекулярной массой 50 kDa праймировал эффекторы врожденной иммунной системы организма, вызвав тем самым развитие иммунного ответа с образованием специфических антител (IgG –19,6 мг/мл, контроль – 10 мг/мл). По-видимому, данный белок является сигнальной молекулой, активирующей лимфоциты, тем самым, стимулируя процесс антителообразования.

В результате проведенных исследований установлено, что протеин T50 обладает способностью модулировать иммунную систему овец. Такая модуляция выражается в

Таблица – Показатели врожденной системы иммунитета на 7-е сутки после введения T50

	Фагоцитарная активность, %	Фагоцитарное число, ед.	Нейтрофилы, %	Моноциты, %	IgM мг/мл	IgG мг/мл
Опыт	45,0±1,9	6,3±0,6	32,8±9,0	2,3±0,6	2,6±0,2	19,6±6,6
Контроль	41,6±4,0	5,8±0,4	31,0±4,5	1,7±0,5	2,1±0,6	10,0±2,0

Примечание: *P < 0,05, r=0,98

активации иммунной системы, а именно в увеличении количества эффекторов врожденной системы иммунитета и уровня иммуноглобулинов классов М и G в течение 14-ти суток после его введения животным.

Заключение

Методами фракционирования нейтральными солями и колоночной хроматографии был получен тимус-специфический белок овец с молекулярной массой 50 kDa. Определена иммунохимическая чистота полученного препарата тимуса с концентрацией белка 4,4 мг/мл методом электрофореза в полиакриламидном геле. В результате проведенных исследований установлено, что белок тимуса с м.м. 50 kDa при введении лабораторным животным стимулирует функциональную активность эффекторов врожденной системы иммунитета и запускает реакции адаптивной системы.

Работа выполнена в рамках государственного задания

ФНЦ "ФГБНУ ВИЭВ РАН" тема № 0578-2014-0018. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Литература.

1. Goldstein A.L., Badamchian M. Thymosins: chemistry and biological properties in health and disease//Expert Opin. Biol.Ther. 2004. №4(4).P. 559-573.
2. Арион В.Я., Зимина И.В., Москвина С.Н. Иммунобиологические свойства и клиническое применение тимозинов и других препаратов тимуса//Иммунопатология, аллергология и инфектология. 2008. №1. С.26-40.
3. Петров Р.В., Хаитов Р.М. Иммуногены и вакцины нового поколения. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2011.-608 с.
4. Ездакова И.Ю., Попова Е.В. Параметры сывороточных антител как маркеры иммунореактивности организма животных// Международный научно-исследовательский журнал. 2015. № 9-3 (40). С. 102-103.
5. Ездакова И.Ю., Попова Е.В., Степнова С.Н. Иммуностимулирующие свойства белка тимуса овец/ Материалы международной научно-практической конференции "Актуальные проблемы биотехнологии в агропромышленном комплексе", Минск 26-27 ноября 2015. С.281-284