

чением ДУ у мужчин более эффективна, чем у женщин.

ПЕПТИДНЫЕ ТИМОМИМЕТИКИ В ЛЕЧЕНИИ АТЕРОСКЛЕРОЗА

Хлюстов В.Н., Ковалева В.Н., Абидов М.Т.
Санаторий «Загорские дали» УД П РФ, НИИ иммунопатологии РАЕН, ООО «АПО-В», Москва

Пептидная тимомиметическая регуляция представляет собой тканеспецифическую регуляцию гомеостаза на уровне целостного организма. Её задача состоит в регуляции развития и функции Т-клеток как циркулирующих, так и находящихся в органах и тканях. Пептиды тимуса активируют экспрессию рецепторов Т-лимфоцитов и их функциональную активность как в культуре клеток, так и в организме.

При миграции костномозговых предшественников «пре-Т-клеток» в вилочковую железу, в результате их контакта с эпителиальным микроокружением тимуса, происходит их дифференцировка на Т-хелперы и Т-супрессоры (1).

Основным гормоном эпителиальных клеток тимуса является тимозин. Впервые в клинике тимозин был применен для лечения ребенка с гипоплазией тимуса (9). Использование тимозина способствовало увеличению количества Т-клеток в крови и улучшению клинической симптоматики. Длительное применение Тимозина у детей с врожденной иммунологической недостаточностью (гипоплазия тимуса, синдромы Ди Джорджа и Вискотга-Олдрича, атаксия-телеангиэктазия и др.), а также у больных со злокачественными новообразованиями, приводило к улучшению показателей иммунного статуса. После проведения лучевой терапии в комбинации с тимозином у пациентов быстрее восстанавливалась иммунологическая реактивность. Кроме этого тимозин применяли с целью иммунокоррекции при вирусных, бактериальных, грибковых инфекциях и других заболеваниях.

При экспериментальном атеросклерозе у кроликов и крыс, получавших тималин внутримышечно через день в течении 3 месяцев, отмечалась четкая тенденция к снижению содержания холестерина и триглицеридов в крови, холестерина в печени и аорте. Степень атеросклеротического поражения аорты у этих животных была значительно ниже чем в контроле (не получавших тималин). При этом значительно уменьшалась сенсбилизация лимфоцитов к атерогенным липопротеидам (7).

Участие иммунологических факторов в развитии атеросклероза не вызывает сомнения. В норме период жизни липопротеидов низкой плотности (ЛПНП) составляет трое суток. При гиперлиппротеидемиях продолжительность жизни ЛПНП возрастает до 4 - 4,5 суток. В результате более длительной циркуляции ЛПНП в

крови происходит их перекисное окисление с образованием модифицированных м-ЛПНП, обладающих чужеродными свойствами. После переработки м-ЛПНП макрофагами (СД14) к антителопродуцирующим В-лимфоцитам (СД19) и Т-хелперам (СД4) и в свою очередь от СД4 к СД19 клеткам передается сигнал о наличии чужеродной субстанции и запускается механизм продукции аутоантител к ЛПНП В-лимфоцитами и формирование клеток иммунологической памяти.

Образование аутоантител является не патологией, а фундаментальной биологической закономерностью. Физиологические аутоантитела участвуют в метаболизме клетки и ткани и служат для выведения уже отживших – гериатрических – собственных макромолекул (2). В силу гигантских размеров и повторяющихся одинаковых антигенных детерминант на поверхности молекулы ЛПНП, их можно отнести к тимуснезависимым антигенам, способным через (СД14) индуцировать размножение и дифференцировку антителопродуцирующих В-лимфоцитов и синтез аутоантител класса IgM независимо от функции Т-хелперов.

Стимулирующий эффект м-ЛПНП на митогенную активность лимфоцитов сочетается с подавлением активности Т-супрессоров (СД8). При этом соотношение СД4/СД8 возрастает и стремится к четырем, пяти, шести (по нашим данным) за счет резкого уменьшения количества СД8, сопровождающееся снижением их активности. В силу уменьшения количества СД8 со снижением их активности и повышением активности СД4 происходит переключение синтеза аутоантител на более дифференцированные иммуноглобулины класса IgG и IgA со снижением контроля со стороны СД8 за количеством синтеза антителообразующими клетками аутоантител. В результате идет непрограммируемый синтез аутоантител с образованием большого количества гигантских макромолекул – циркулирующих иммунных комплексов (ЦИК) «м-ЛПНП+аутоантитело». ЦИК «м-ЛПНП+аутоантитело» активно захватываются эндотелиальными клетками сосудистой стенки через Fc-фрагмент аутоантитела. Модифицированные-ЛПНП в очагах атерогенеза запускают каскад реакций, характеризующих иммунное воспаление, способствующих прогрессированию атеросклероза (3).

В связи с формированием клеток иммунологической памяти к синтезу патологических аутоантител к ЛПНП и наличием иммунного воспаления в очагах атерогенеза, весь этот процесс приобретает хроническое течение по типу реакции гиперчувствительности с само регуляцией замедленного типа. **При этом уже не имеет принципиального значения уровни холестерина и триглицеридов в крови, поскольку иммуновоспалительный механизм запущен, и он будет прогрессировать** (6). Вот почему, на практике, мы не видим обратного развития атероскле-

ротического процесса от применения статинов, а имеем только замедление атеросклеротического поражения сосудистой стенки.

В лечении атеросклероза важно не только применение средств снижающих холестерин, но и использование препаратов нормализующих Т-клеточный иммунитет (Климов). В настоящее время одним из таких препаратов является **ТИМОЗИН**.

Источником для выделения и производства препаратов тимомимических пептидов в основном является экстракт из тимуса телят до 1 года жизни. В последней четверти XX века были разработаны такие лекарственные средства как тимозин, тимопоэтин, тимостимулин, тактивин, тималин и др.

В институте экспериментальной медицины АМН СССР А.Н. Климовым, Ю.М. Лопухиным были проведены работы по лечению атеросклероза и ИБС иммуномодулятором **Тактивин**ом в дозе 100 мкг подкожно номером 5 через день. После лечения наблюдалось четкое снижение коэффициента СД4/СД8, за счет увеличения Т-супрессоров, т.е. снижение аутоагрессии. В результате уменьшается синтез патологических аутоантител к ЛПНП и соответственно снижается количество ЦИК «м-ЛПНП+аутоантитело». Но через 1,5 – 2 месяца после лечения В-клетки вновь выходят из под контроля иммунорегуляторных лимфоцитов. Авторы рекомендуют с таким интервалом проводить повторные курсы иммуномодулирующей терапии (4, 5).

Материалы и методы

В санатории «Загорские дали» УД П РФ с 1997 г. прошли реабилитацию более 300 больных ИБС после АКШ с 14 – 20 дня после операции. Из них 44 пациента в возрасте от 40 до 70 лет (средний возраст 53 года) продолжали наблюдаться в течении 3, 5, 7 и более лет ежегодно. Инфаркт миокарда до операции АКШ перенесли 27 больных. Шунтирование одного сосуда проведено 4-м больным, двух сосудов 8-и больным, трёх – 15-ти больным, четырёх – 12-ти больным и пять шунтов – 6-ти больным.

До начала курса реабилитации и пред выпиской больным проводилось исследование липид-транспортной системы и состояние иммунологического статуса, а именно определялось количество аутоантител к ЛПНП (8), количество иммуноглобулинов, В-лимфоцитов, Т-хелперов, Т-супрессоров и коэффициент аутоагрессии СД4/СД8 (исследование проводилось в лаборатории иммунологии ЦКБ УД П РФ). У обследованных больных, показатели липидтранспортной системы в среднем составили: общий холестерин (Хс) – $7,6 \pm 0,5$ ммоль/л, триглицериды – $2,4 \pm 0,4$ ммоль/л, Хс липопротеидов высокой плотности (ЛПВП) – $1,0 \pm 0,1$ ммоль/л, Хс ЛПНП – 5, 6 ммоль/л, К.А. – 6,6. Количество аутоантител к ЛПНП в сыворотке крови было $175,7 \pm 8,8 \times 10^{-3}$ г/л, а в ЦИК $2,4 \pm 0,13 \times 10^{-3}$ г/л, при этом коэф-

фициент аутоагрессии СД4/СД8 составил в среднем 3,8.

Все больные получали стандартную санаторно-курортную терапию, включающую в себя медикаментозную терапию, физио-бальнео лечение, гипербарическую оксигенацию, дифференцированные методики лечебной физкультуры, диетотерапию и аутогенную тренировку. Для объективизации результатов в качестве функционального контроля использовались ЭКГ, ВЭМ, Холтеровское мониторирование ЭКГ и тетраполярная реография. В группе вмешательства у 30 больных в качестве иммуномодулирующей терапии применялся Тактивин в дозе 100 мкг через день подкожно номером 5.

После курса иммуномодулирующей терапии в группе вмешательства коэффициент аутоагрессии СД4/СД8 снизился до 2,6, при этом количество аутоантител к ЛПНП уменьшилось в сыворотке до $110 \pm 6,5 \times 10^{-3}$ г/л, а в ЦИК до $1,1 \pm 0,16 \times 10^{-3}$ г/л.

Как показали работы Климова А.Н. длительность эффекта иммуномодулирующей терапии сохранялись около 1,5 – 2 месяцев. Но препараты выделенные от телят, в настоящее время не получили должного применения из за возможности переноса вирусных заболеваний данных животных на человека. В связи с этим, нами **ООО «АПО-В»**, в качестве сырья для получения тимозина была взята вилочковая железа от народившегося 1 месячного гренландского тюленя (Белёк и Серка). Активность данного препарата выше чем у препарата от годовалого теленка. При исследовании тимозина было выявлено, что препарат выделенный из вилочковой железы гренландского тюленя термолабилен. В связи с этим нами была изменена технологическая цепочка выделения тимозина, в которой этап прогревания и участие солевых буферных растворов были исключены. Все работы по выделению тимозина проводились при + 4 г С на дистиллированной воде.

Для сравнительной оценки активности препаратов проведено исследование иммуностропных эффектов препарата «Тимозина Т» - полученного по нашей технологии и «Тимозина Р» - референс – контроля, полученного по стандартной методике (Патент на изобретение № 2149006 от 20.05.2000 г.) и альфа-фетопротеина.

В качестве критериев оценки биологической активности использованы:

1. Действие на цитотоксическую активность мононуклеарных клеток периферической крови здоровых доноров по отношению к линии опухолевых клеток К562;
2. Влияние на пролиферативную активность мононуклеарных клеток здоровых доноров;
3. Влияние на митогенез мононуклеарных клеток здоровых доноров.

Выделение мононуклеарных лейкоцитов (МЛ)

МЛ выделяли из стабилизированной гепарином (25 Ед/мл) периферической крови 25 здоровых доноров на одноступенчатом градиенте фикола («Pharmacia», плотностью 1.077 г/см^3), центрифугированием при 400 g в течение 30 минут. Мононуклеарные лейкоциты, образовавшие интерфазное кольцо, собирали пипеткой и трехкратно отмывали в среде 199. После каждой отмывки в 10-кратном объеме среды клетки осаждали центрифугированием при 200 g.

Препараты

В работе использованы лиофилизированные препарат «Тимозин Т» и Контроль (референц-образец тимозина Р). Биологическую активность исследуемых препаратов сравнивали в концентрациях 100 мкг/мл, 10 мкг/мл, 1 мкг/мл и 0,1 мкг/мл.

Цитотоксический тест (НК-активность)

Цитотоксическую активность мононуклеарных лейкоцитов периферической крови доноров под воздействием препаратов тимозина определяли на НК-чувствительной линии опухолевых клеток К-562. Опухолевые клетки (1×10^4 в 1 мл) инкубировали в культуральной среде с МЛ, обработанными тимозином в дозах 0,1; 1,0; 10,0; 100,0 мкг/мл (в соотношениях клетки-мишени/эффекторы равных 1:5, 1:2, 1:1 и 1:0,5) в плоскодонных 96-луночных микропланшетах (фирмы Costar, Франция) 18 часов. Затем в лунки добавлялся витальный краситель МТТ (фирмы Sigma, США) и по оптической плотности, измеряемой на мультиканале МСС-340 (фирмы Labsystem, Финляндия), рассчитывался процент лизиса опухолевых клеток (процент цитотоксичности).

Оценка пролиферативной активности МЛ

Оценку пролиферативной активности МЛ при действии препаратов проводили в колориметрическом тесте с использованием витального красителя AlamarBlue (Biosours, США) в стерильных условиях, используя ламинарный бокс с горизонтальным потоком воздуха (JuanVFS 906). Суспензию МЛ, обработанную препаратами, в обогащенной среде RPMI 1640 вносили в 96-луночные планшеты в количестве 10×10^3 клеток/лунку инкубировали в течение 4 суток в стандартных условиях культивирования. По окончании инкубации в лунки вносили краситель AlamarBlue (10%). Флюоресценцию измеряли после четырехчасовой инкубации при 37°C, 5% CO₂ на флюориметре VersaFluor V13 (Vtotal) при длине волны возбуждения 530–560 нм, эмиссии 590 нм и выражали в условных единицах (у.е.) флюоресценции. Рассчитывали индекс стимуляции (ИС), представляющий собой отношение пролиферативной активности МЛ, инкубиро-

ванных с Контролем к пролиферативной активности МЛ при стимуляции «Тимозина Т».

Результаты исследования

Результаты изучения биологической активности препаратов представлены в таблицах.

В концентрации 100 мкг/мл препарат «Тимозин Т» обладал большей активностью в стимуляции НК-активности в сравнении с контролем ($p < 0.05$)

Что касается митогенного действия, то в концентрации 100 мкг/мл препарат «Тимозин Т» также превосходил по активности референц-контроль.

Как следует из результатов тестовых испытаний иммуностимулятор, полученный в нашей модификации, обладает более высокой активностью, с доза зависимым эффектом, чем препарат выделенный с прогреванием биологической массы.

ООО «АПО-В» приглашает к сотрудничеству заинтересованных лиц для более глубокого изучения нашего препарата от гренландского тюленя. Препарат выпускается как биохимический реактив по 1 мг в стерильных 5 кубовых флаконах стоимостью по 100 Евро.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ:

1. Галактионов В.Г. // Иммунология. Москва, 1998, с. 157 – 189.
2. Грабарь П. и др. Иммуноэлектрофоретический анализ. Москва, 1963.
3. Климов А.Н. // Иммунореактивность и атеросклероз. Ленинград «Медицина». 1986.
4. Климов А.Н., Лопухин Ю.М., Алмазов В.А. и др. // Влияние Т-активина на течение ИБС в случаях развития сенсбилизации к апопротеин-В-содержащим липопротеидам. Кардиология, 1990, № 9, с. 40 – 44.
5. Климов А.Н., Алмазов В.А., Нагорнев В.А. // Применение тактивина для лечения больных ИБС. Тер. Архив. 1995, № 9, с. 24 – 27.
6. Нагорнев В.А. и др. // Атерогенез как отражение развития иммунного воспаления в сосудистой стенке. Вест. РАМН. 2000, № 10, с. 364 – 371.
7. Рыженков В.Е. и др. // Вопр. Мед. Химии. 1988, № 1, с. 51 – 56.
8. Хлюстов В.Н. // Способ количественного определения аутоантител к липопротеидам низкой плотности в сыворотке крови. Патент на изобретение, № 2137134 от 1999 г.
9. Goldstein et al. - First clinical trial with thymosin: reconstitution of T-cell in patients with cellular immunodeficiency disease // Transplant. Proc. 1975. Vol. 7, № 1 (Suppl.). P. 681 – 686.

Таблица 1. Действие «Тимозина Т» на цитотоксическую активность мононуклеарных клеток здоровых доноров к линии опухолевых клеток K562.

Концентрация препарата мкг/мл	Уровень цитотоксичности %		
	Тимозин Т	Тимозин Р	Альфа-фетопротеин
100	91,0±5,2*	82,2±5,3*	96,7±4,1*
10	82,2±3,5*	83,5±3,6*	78,0±4,6*
1	77,0±4,3*	83,4±4,1*	77,3±3,9*
0,1	73,0±3,4*	82,1±3,8*	73,2±4,1*
0,01	30,0±3,7	27,3±2,4	24,7±2,6

* - статистически значимые различия ($p < 0,05$).**Таблица 2.** Влияние «Тимозина Т» на пролиферативную активность и митогенез мононуклеарных клеток здоровых доноров

Препарат	Концентрация мкг/мл	Бластные формы, у.е.	Индекс стимуляции
Контроль	-	0,095±0,02	-
Тимозин Т	100	0,793±0,07*	8,1
	10	0,595±0,10*	6,2
	1	0,571±0,02*	5,3
	0,1	0,500±0,04*	6,0
Тимозин Р	100	0,770±0,05*	7,8
	10	0,765±0,10*	8,0
	1	0,462±0,12*	4,9
	0,1	0,529±0,0,07	5,6
Альфа-фето-протеин	100	0,655±0,05*	6,9
	10	0,517±0,04*	5,4
	1	0,510±0,07*	5,4
	0,1	0,309±0,03*	3,2

* - статистически значимые различия ($p < 0,05$).**Таблица 3.** Влияние «Тимозина Т» на пролиферативную активность мононуклеарных клеток здоровых доноров

Препарат	Концентрация	Бластные формы, %	Жизнеспособные клетки
Контроль	-	3,4±0,7	98,0±0,5
Тимозин Т	100	98,5±5,2*	98,0
	10	97,0±4,6*	97
	1	87,0±4,6*	97
	0,1	32,2±1,5*	98
Тимозин Р	100	90±5,8*	97
	10	88,0±1,3*	98
	1	83,0±2,5*	98
	0,1	35,0±5,6*	97

* - статистически значимые различия ($p < 0,05$).

ПОКАЗАТЕЛИ НЕЙРОГОРМОНОВ В ПРОГНОЗИРОВАНИИ ТЕЧЕНИЯ

КОЛОРЕКТАЛЬНОГО РАКА

Чиж А.А., Громов М.С., Чиж А.Г.

Военно-медицинский институт
Саратов, Россия

В структуре онкологической патологии в России, как и в других странах мира, рак ободочной и прямой кишок выходит на одно из первых мест, опережая по темпам роста рак желудка, кожи и гениталий (Трапезников Н.Н. с соавт.,

1997; Шельгин Ю.А., 1997; Аксель Е.М. с соавт., 1999).

Ведущим в канцерогенезе является нарушение генетического аппарата соматической клетки (Стирнс М.В., 1983; Сокова О.И. с соавт., 1997; Фром Г., 1998). Важным является и эндокринный фон, на котором развивается опухоль (Furth J., 1971; Смоляников А.В., 1990; Berstein L.M., 1995). Гормоны как связующее звено многих механизмов онкогенеза, могут выступать в качестве промоторов либо ингибиторов опухоли