

ВЛИЯНИЕ КОРОТКИХ ПЕПТИДНЫХ ФРАГМЕНТОВ ТБГ НА ЦИТОКИНОВЫЙ ПРОФИЛЬ КРЫС WISTAR ПРИ АЛЛОГЕННОЙ ТРАНСПЛАНТАЦИИ В ЭКСПЕРИМЕНТЕ IN VIVO

Тимганова В.П.¹, Бочкова М.С.^{1,2}, Шардина К.Ю.¹, Ужвиюк С.В.¹,
Гутина Е.В.², Раев М.Б.^{1,2}, Любимов А.В.³, Заморина С.А.^{1,2}

¹ ФГБУН «Институт экологии и генетики микроорганизмов Уральского отделения Российской академии наук», г. Пермь, Россия

² ФГБОУ ВО «Пермский государственный национальный исследовательский университет», г. Пермь, Россия

³ Университет Иллинойса, Чикаго, США

Резюме. Трофобластический бета-1-гликопротеин (ТБГ, PSG) — белок плаценты с плейотропными биологическими эффектами, в частности иммунорегуляторным и иммуносупрессивным потенциалом. Применение рекомбинантного ТБГ способно оказывать терапевтический эффект в экспериментах на животных с индуцированными аутоиммунными заболеваниями. В последнее время поиск биологических эффектов коротких линейных пептидов (short linear motifs, SLiMs) является новой стратегией создания фармакологических препаратов. В первичной структуре различных PSG выявлены тетрапептидные участки: YQCE, YECE и YACS, которые являются SLiMs с иммуномодулирующей активностью. Целью исследования является оценка перспектив применения пептидных фрагментов ТБГ в качестве фармакологического препарата для модуляции трансплантационного иммунитета. В работе использовали оригинальную модель реакции «хозяин против трансплантата» на крысах-самцах Wistar без предварительного кондиционирования костного мозга (КМ) у реципиентов. Животным вводили коктейль пептидных фрагментов ТБГ на фоне аллогенной трансплантации клеток КМ в динамическом эксперименте, оценивая цитокиновый профиль как интегральный показатель иммунного ответа. Уровень цитокинов оценивали мультиплексным методом при помощи набора Bio-Plex Pro™ Rat 23-Plex. Статистическую обработку данных проводили, используя двухфакторный дисперсионный анализ и post-hoc тест Тьюки для множественных сравнений. Показано, что в группе животных, которым вводили только КМ, наблюдалось увеличение концентрации провоспалительных цитокинов IFN γ , IL-1 α , IL-1 β , IL-18, а также уровня G-CSF, GM-CSF и IL-7. В группе животных, которым вводили КМ + пептиды ТБГ наблюдалось повышение IFN γ , IL-6, TNF α , которое снижалось к концу эксперимента, и фиксировалось повышение уровня противовоспалительных

Адрес для переписки:

Заморина Светлана Анатольевна
ФГБУН «Институт экологии и генетики
микроорганизмов Уральского отделения Российской
академии наук»
614081, Россия, г. Пермь, ул. Голева, 13.
Тел.: 8 (342) 280-77-94.
Факс: 8 (342) 280-92-11.
E-mail: mantissa7@mail.ru

Address for correspondence:

Zamorina Svetlana A.
Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms,
Ural Branch, Russian Academy of Sciences
614081, Russian Federation, Perm, Golev str., 13.
Phone: 7 (342) 280-77-94.
Fax: 7 (342) 280-92-11.
E-mail: mantissa7@mail.ru

Образец цитирования:

В.П. Тимганова, М.С. Бочкова, К.Ю. Шардина,
С.В. Ужвиюк, Е.В. Гутина, М.Б. Раев, А.В. Любимов,
С.А. Заморина «Влияние коротких пептидных
фрагментов ТБГ на цитокиновый профиль крыс Wistar
при аллогенной трансплантации в эксперименте in vivo» // Медицинская иммунология, 2022. Т. 24, № 3.
С. 491-506. doi: 10.15789/1563-0625-EOS-2472
© Тимганова В.П. и соавт., 2022

For citation:

V.P. Timganova, M.S. Bochkova, K.Yu. Shardina,
S.V. Uzhviyuk, E.V. Gutina, M.B. Rayev, A.V. Lyubimov,
S.A. Zamorina “Effect of short PSG peptide fragments on the
cytokine profile in Wistar rats during allogeneic transplantation
in vivo”, Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya
Immunologiya, 2022, Vol. 24, no. 3, pp. 491-506.
doi: 10.15789/1563-0625-EOS-2472
DOI: 10.15789/1563-0625-EOS-2472

цитокинов IL-4 и IL-13 в сыворотке крови животных на 14-е сутки. Помимо этого, введение пептидов ТБГ приводило к повышению уровня IL-2, M-CSF, MCP-1 и RANTES также на 14-е сутки от начала эксперимента и постепенному снижению их уровня к концу эксперимента, в то время как в контрольной группе сохранялась выраженная тенденция к увеличению концентраций этих и других цитокинов. Таким образом, показано, что применение пептидов ТБГ в процессе развития иммунного ответа на аллотрансплантат ускоряет нормализацию концентраций подавляющего большинства исследованных цитокинов, что свидетельствует об иммунофармакологическом потенциале этих пептидов. Полученные данные могут использоваться для разработки фармакологического препарата на основе исследуемых пептидов для коррекции дисбаланса иммунитета.

Ключевые слова: трофобластический β 1-гликопротеин, аллогенная трансплантация, короткие пептиды, цитокиновый профиль, крысы Wistar

EFFECT OF SHORT PSG PEPTIDE FRAGMENTS ON THE CYTOKINE PROFILE IN WISTAR RATS DURING ALLOGENEIC TRANSPLANTATION *IN VIVO*

Timganova V.P.^a, Bochkova M.S.^{a,b}, Shardina K.Yu.^a, Uzhviyuk S.V.^a, Gutina E.V.^b, Rayev M.B.^{a,b}, Lyubimov A.V.^c, Zamorina S.A.^{a,b}

^a Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms, Ural Branch, Russian Academy of Sciences, Perm, Russian Federation

^b Perm State National Research University, Perm, Russian Federation

^c University of Illinois, Chicago, USA

Abstract. Pregnancy-specific beta-1-glycoprotein (PSG) is a protein with pleiotropic biological effects, particularly immunoregulatory and immunosuppressive potential. The use of recombinant PSG may exert therapeutic effects in experimental animals with induced autoimmune diseases. Recently, a search for the biological effects of short linear motifs (SLiMs) has become a new strategy for designing the pharmacological compounds. Tetrapeptide regions have been identified in the primary structure of several PSGs: YQCE, YECE and YACS, these SLiMs exhibit immunomodulatory activity. The aim of our study was to evaluate the prospectives for usage of PSG peptide fragments as pharmacological agents to modulate transplant immunity. We used an original model of host-versus-graft response in male Wistar rats transplanted with bone marrow, without prior conditioning treatment of recipients. We used a cocktail of the PSG peptide fragments administered to Wistar rats in the course of allogeneic bone marrow transplantation (BM) in dynamic manner, evaluating the cytokine profile as an integral index of immune response. Cytokine levels were determined by multiplex method using Bio-Plex Pro™ Rat 23-Plex kit. Statistical processing of the data was performed by means of two-way analysis of variance and Tukey's *post hoc* test for multiple comparisons. We have found that the levels of pro-inflammatory cytokines (IFN γ , IL-1 α , IL-1 β , IL-18), as well as the contents of G-CSF, GM-CSF and IL-7 were increased in the animals injected with BM only. In the group of animals injected with BM + PSG peptides, an increase in IFN γ , IL-6, TNF α was observed, which decreased by the end of the experiment. Increased levels of anti-inflammatory cytokines IL-4 and IL-13 were detected in blood serum of the animals on day +14. Moreover, administration of PSG peptides also led to increase in IL-2, M-CSF, MCP-1, and RANTES levels on day 14 from the beginning of the experiment, and to a gradual decrease in their levels till the end of the experiment. Meanwhile, control group showed a marked tendency for increase of these and other cytokines. Thus, it was shown that the use of PSG peptides upon development of immune response to BM allograft may promote a return to normal levels for the most cytokines studied, thus presuming the immunopharmacological potential of these peptides. The obtained data can be used to develop a pharmacological preparation of the studied peptides to correct the imbalance of immune system.

Keywords: pregnancy-specific β 1-glycoprotein, allogeneic transplantation, short peptides, cytokine profile, Wistar rats

Исследование выполнено при финансовой поддержке правительства Пермского края в рамках научного проекта № С-26/509.

Введение

Трофобластический бета-1-гликопротеин (ТБГ, PSG) – белок с плейотропными биологическими эффектами, который продуцируется клетками плаценты в период беременности. Концентрация ТБГ в сыворотке к III триместру достигает 200-400 мкг/мл, что значительно превышает концентрации других белков плаценты [3]. ТБГ обладает выраженным иммунорегуляторным потенциалом, регулируя активность основных эффекторов иммунного ответа [5]. Так, известно, что PSG достоверно увеличивает уровень адаптивных Treg *in vitro*, а в отношении активности индоламин-2,3-диоксигеназы (IDO) моноцитов реализует стимулирующий эффект. PSG способен подавлять дифференцировку и пролиферацию интерлейкин-17-продуцирующих Т-хелперов (Th17), а также продукцию ими ключевых провоспалительных цитокинов (IL-8, IL-10, IL-17, IFN γ , MCP-1, TNF α). На уровне Т-клеток иммунной памяти PSG препятствует конверсии наивных Т-клеток в терминально-дифференцированную эффекторную субпопуляцию Т-хелперов. PSG преимущественно подавляет продукцию Th1-цитокинов иммунокомпетентными клетками, но разнонаправленно регулирует продукцию Th2-цитокинов [5]. Применение рекомбинантного ТБГ способно оказывать терапевтический эффект в экспериментах на животных с индуцированными аутоиммунными патологиями [7, 13]. В 2019 г. показан терапевтический эффект ТБГ для подавления реакции отторжения трансплантата [19]. Таким образом, концептуально, ТБГ реализует так называемое «точечное» подавление иммунитета в отношении фетальных антигенов, являясь одним из важнейших факторов, формирующих иммунную толерантность.

Однако практическое применение белков беременности как в нативной, так и в рекомбинантной форме связано с массой сложностей этического и экономического характера. В последнее время поиск биологических эффектов коротких линейных пептидов (short linear motifs, SLiMs) является новой стратегией создания фармакологических препаратов [28]. SLiMs являются высококонсервативными пептидными участками белковой молекулы длиной 3-10 аминокислот, которые разграничивают подлинные синтаксические и семантические единицы в белке. В перспективе они представляют собой новый класс препаратов, способных модулировать внутримолекулярные и межмолекулярные связи белков [23]. Например, уже существует целый

ряд препаратов, на основе SLiMs, которые имитируют или блокируют конкретное белок-белковое взаимодействие: Tritace[®], Vasotec[®], Accupril[®], Lotensin[®], Zovirax[®], Stutnet[®], Gleevec[®], Sprycel[®]. Важно отметить, что в последние годы половина всех одобренных пептидных препаратов были линейными пептидами [6].

В первичной структуре различных PSG выявлены тетрапептидные участки: YQCE (присутствует во всех PSG), YECE и YACS (присутствуют в большинстве типов PSG), являющиеся консенсусным мотивом YxCx (в данном случае, SLiMs), у которого выявлена иммуномодулирующая активность [26].

Таким образом, целью исследования является изучение влияния коротких пептидных фрагментов (SLiMs) ТБГ (YECE, YQCE, YVCS и YACS) на цитокиновый профиль при формировании иммунного ответа на введение аллогенных клеток костного мозга в экспериментальной модели крыс Wistar.

Известно, что изменения в иммунной системе реципиента на введение аллогенных клеток костного мозга происходят в первые 1-3 недели после трансплантации [27]. Цитокиновый профиль в данном случае является интегральным показателем развития иммунного ответа [18]. Прикладным аспектом исследования является оценка перспектив применения пептидных фрагментов ТБГ в качестве фармакологического препарата для лечения нежелательных эффектов аллотрансплантации. Полученные данные могут использоваться для разработки научно обоснованных технологий коррекции дисбаланса иммунитета, особенно для аутоиммунных заболеваний в виде фармакологического препарата на основе исследуемых пептидов.

Материалы и методы

В эксперименте задействованы самцы крыс линии Wistar (n = 36) в возрасте от 2-3 месяцев (m \approx 250 г). Животные содержались в виварии ПГНИУ в условиях, соответствующих ГОСТ 33216-2014 «Правила работы с лабораторными грызунами и кроликами».

Схема эксперимента

В работе использовали оригинальную модель реакции «хозяин против трансплантата» (РХПТ), разработанную по аналогии с моделью реакции «трансплантат против хозяина» [17]. Известно, что при полноценной трансплантации костного мозга на животных моделях с кондиционированием костного мозга реципиента и последующей иммуносупрессивной терапией наблюдается высокая смертность экспериментальных животных [8, 39]. В нашей модели животным вводили аллогенную суспензию клеток костного мозга

внутрибрюшинно без кондиционирования и базовой иммуносупрессивной терапии, что позволяет адекватно оценить иммунный ответ по цитокиновому профилю без экстремальных воздействий.

Животные были разделены на 3 группы: 1-я (n=4) – интактные животные; 2-я – контроль (n=16), которым внутрибрюшинно вводили взвесь костного мозга (КМ) (10^7 клеток, обработанных камптотецином (50 мкг/мл, Tocris Bioscience, Великобритания) в 100 мкл физиологического раствора; 3-я – опыт (n=16), которым вводили клетки костного мозга, а затем внутримышечно вводили смесь 4 исследуемых коротких пептидов ТБГ в объеме 100 мкл физиологического раствора на 0-е, 3-и, 6-е, 9-е и 12-е сутки (рис. 1).

Клетки костного мозга выделяли из бедренных костей, подсчитывали и обрабатывали камптотецином (50 мкг/мл) в среде RPMI-1640 в течение 1 часа при температуре 37 °С для того, чтобы исключить деление клеток и возможность развития реакции трансплантат против хозяина (РТПХ) [31]. Далее клетки отмывали физиологическим раствором, доводили до концентрации

$10^7/100$ мкл и вводили 32-м животным внутрибрюшинно. В работе применяли пептиды ТБГ (YACS, YQCE, YVCS, YECE), синтезированные на заказ ООО «Рашн пептайд» (Россия), предварительно очищенные нами от эндотоксина при помощи колонок Pierce™ High Capacity Endotoxin Removal Spin Columns производства Thermo Scientific (США). Далее объединяли по 12,5 мкг каждого пептида и вводили по 50 мкг смеси в 100 мкл апиrogenного физиологического раствора. Таким образом, в исследовании применяли коктейль пептидов YACS, YQCE, YVCS, YECE в качестве экспериментальной терапии РХПТ.

Выведение животных из эксперимента проводилось на 3-и, 7-е, 14-е и 21-е сутки после аллотрансплантации (АТ) путем декапитации в соответствии с международными правилами проведения работ с экспериментальными животными. Одновременно выводили по 4 крысы из каждой экспериментальной группы (в группе интактных крыс – по 1), одновременно производя забор крови (рис. 1). Далее клетки крови осаждали 15 минут на 1500 об/мин, отбирали сыворотку крови, которую затем осветляли

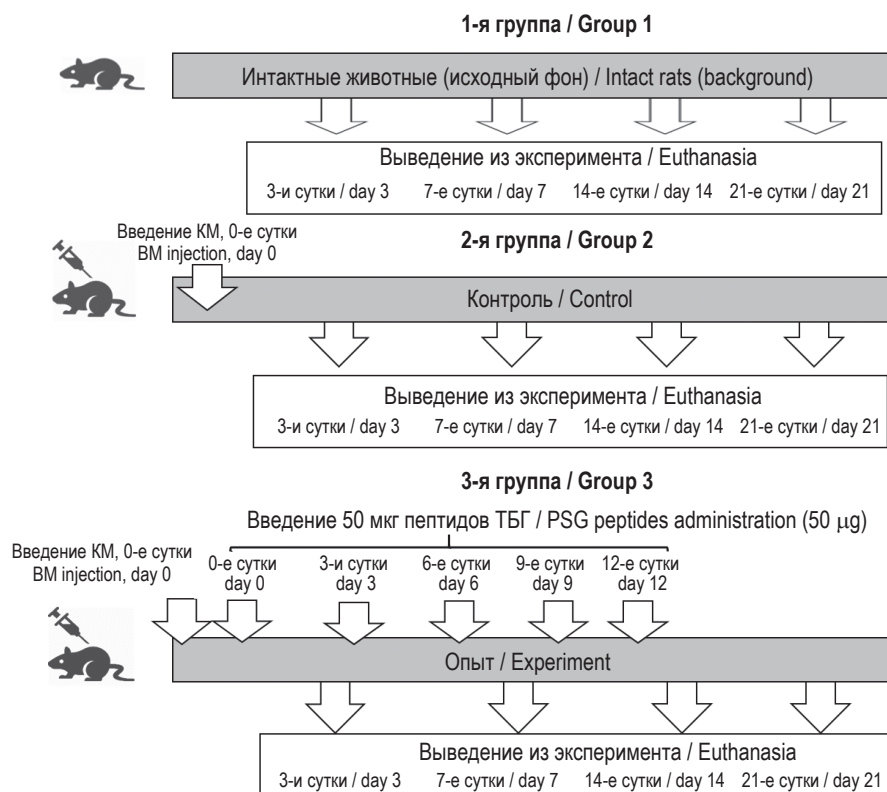


Рисунок 1. Схема проведения экспериментов по изучению влияния пептидов ТБГ на реакцию хозяин против трансплантата

Примечание: КМ – костный мозг.

Figure 1. Scheme of experiments to study the effect of PSG peptides on the host-versus-graft reaction

Note. BM, bone marrow.

центрифугированием на 14 000 об/мин в течение 30 мин при $t 4^{\circ}\text{C}$.

Измерение концентрации цитокинов в сыворотке крови крыс

Для определения уровня цитокинов / хемокинов / ростовых факторов G-CSF, GM-CSF, фактора роста и миграции кератиноцитов (GRO/KC), $\text{IFN}\gamma$, IL-1 α , IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-10, IL-12 (p70), IL-13, IL-17A, IL-18, макрофагального колониестимулирующего фактора (M-CSF), MCP-1, MIP-1 α , MIP-3 α , RANTES, TNF α , VEGF в плазме крыс использовали коммерческий набор Bio-Plex Pro™ Rat Cytokine Magnetic Bead Panel 23-Plex производства BioRad Laboratories, Inc. (США). Считывание результатов проводили на мультиплексном анализаторе MAGPIX (BioRad Laboratories, Inc., США) по технологии Luminex xMAP с использованием программного обеспечения xPONENT 3.1. Для построения стандартных кривых использовали пятипараметрический логистический (5PL) метод анализа. Основные метрологические характеристики применяемого метода определения растворимых клеточных факторов в плазме: минимальное определяемое количество 10^{-3} пг/мл, погрешность определения (CV%) $\pm 7\%$ в пределах одного определения (intraassay), $\pm 10\%$ – для определений по разным стандартным графикам (interassay). Обработку полученных данных осуществляли в программе BioPlex Pro Manager. Статистическую обработку данных проводили с помощью программы GraphPad Prism 8, используя двухфакторный дисперсионный анализ (two-way ANOVA) и post-hoc тест Тьюки для множественных сравнений. Сравнивали показатели концентраций цитокинов на 3-и, 7-е, 14-е и 21-е сутки после АТ внутри каждой группы, а также в конкретной временной точке разных групп животных (интактной, контрольной и опытной). Различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$. В таблицах представлены только значения p для статистически значимых отличий.

Результаты

Изменения уровней провоспалительных цитокинов на фоне аллогенной трансплантации и введения коротких пептидов ТБГ

Аллотрансплантация клеток костного мозга (контрольная группа животных) приводила к повышению концентраций провоспалительных факторов, а именно: IL-1 β на 14-е и 21-е сутки, а $\text{IFN}\gamma$, IL-1 α и IL-18 только на 21 сутки от начала эксперимента по отношению к показателям интактных крыс (табл. 1).

Введение пептидов ТБГ на фоне аллотрансплантации костного мозга приводило к статистически значимому повышению уровня IL-1 β

по сравнению с исходным фоном (интактные крысы) на 3-и сутки после АТ. Концентрация этого цитокина возрастала по отношению к группе интактных животных в 5 раз, а по отношению к контролю (тоже статистически значимо) более чем в 2 раза. Затем, на 14-е и 21-е сутки после АТ концентрация IL-1 β снижалась до значений ниже, чем в контрольной группе. Однако показатели все еще были выше, чем в интактной группе, статистически значимых отличий в эти сроки по отношению к контролю обнаружено не было (табл. 1).

Концентрации $\text{IFN}\gamma$, IL-6 и TNF α в группе животных, которым вводились пептиды ТБГ, возрастали на 14-е сутки от начала эксперимента по сравнению с интактными животными и по сравнению с 3-ми сутками после АТ в этой же группе, однако к 21-м суткам происходило снижение уровня этих цитокинов в сыворотке крови (табл. 1). Обращает на себя внимание, что через 21 сутки после аллотрансплантации в контрольной группе сохраняется тенденция к нарастанию уровня провоспалительных цитокинов, в то время как в группе животных, которым вводили пептиды ТБГ, наоборот, наблюдается выраженная тенденция к снижению таких факторов воспаления как IL-1 α , IL-1 β , IL-17A, IL-18, а также в статистически значимом снижении концентраций $\text{IFN}\gamma$ и IL-6 по отношению к 14-м суткам после АТ.

Изменения уровней противовоспалительных цитокинов на фоне аллогенной трансплантации и введения коротких пептидов ТБГ

Аллотрансплантация клеток костного мозга животным не приводила к статистически значимым изменениям уровней противовоспалительных цитокинов в сыворотке крови по сравнению с группой интактных крыс, хотя тенденция к их увеличению наблюдалась (табл. 2).

Интересно, что в группе животных, которым вводили пептиды ТБГ (опытная группа), наблюдалось статистически значимое увеличение концентраций IL-4, IL-10 и IL-13 на 14-е сутки, а IL-13 еще и на 21-е сутки после начала эксперимента по сравнению с интактными животными (табл. 2).

Уровни IL-4 и IL-13 в опытной группе нарастали с 3-х по 14-е сутки после АТ, чего не наблюдалось в контрольной группе (рис. 2, 3).

Изменения уровней регуляторных цитокинов и колониестимулирующих факторов на фоне аллогенной трансплантации и введения коротких пептидов ТБГ

На фоне аллотрансплантации клеток костного мозга, у животных наблюдалось повышение уровней колониестимулирующих факторов (G-CSF, GM-CSF) на 14-е сутки и лимфопоэтического фактора роста (IL-7) на 14-е и 21-е сутки

ТАБЛИЦА 1. КОНЦЕНТРАЦИИ ПРОВОСПАЛИТЕЛЬНЫХ ЦИТОКИНОВ СЫВОРОТКИ КРОВИ КРЫС WISTAR ПРИ АЛЛОГЕННОЙ ТРАНСПЛАНТАЦИИ И ВВЕДЕНИИ КОРОТКИХ ПЕПТИДОВ ТБГ В ЭКСПЕРИМЕНТЕ *IN VIVO*, пг/мл, Me (Q_{0,25}-Q_{0,75})

TABLE 1. CONCENTRATIONS OF PRO-INFLAMMATORY CYTOKINES IN THE BLOOD SERUM OF WISTAR RATS AFTER ALLOGENEIC TRANSPLANTATION AND ADMINISTRATION OF SHORT PSG PEPTIDES IN THE EXPERIMENT *IN VIVO*, pg/mL, Me (Q_{0,25}-Q_{0,75})

	IFN γ	IL-1 α	IL-1 β	IL-6	IL-17A	IL-18	TNF α
Интактные Intact	205,91 (188,53- 241,57)	236,43 (198,89- 271,13)	62,02 (53,22- 75,05)	262,70 (259,38- 307,72)	33,72 (30,05- 41,62)	2427,39 (1941,47- 2830,98)	681,15 (660,15- 760,61)
3-и сутки / day 3							
Контроль Control	459,41 (402,05- 581,68)	291,52 (268,33- 336,97)	122,45 (106,02- 137,92) p = 0,027*	582,03 (422,82- 783,43)	56,23 (52,90- 68,05)	2462,59 (2191,91- 3066,95)	848,73 (711,59- 1186,90)
Пептиды ТБГ PSG peptides	515,13 (456,07- 564,75) p = 0,013*	420,19 (379,40- 437,93)	310,42 (211,51- 389,20) p = 0,001** p = 0,020#	577,11 (557,80- 639,98) p = 0,040*	77,11 (71,70- 83,81)	3283,31 (2566,44- 4103,72)	660,15 (644,38- 689,34) p = 0,014*
7-е сутки / day 7							
Контроль Control	447,45 (343,28- 567,33)	323,25 (260,87- 351,21)	111,18 (92,26- 135,64) p = 0,021*	683,28 (503,96- 805,35)	49,58 (41,95- 62,14)	3158,74 (3053,52- 3513,09)	798,73 (648,72- 1032,23)
Пептиды ТБГ PSG peptides	483,19 (428,15- 638,80)	147,39 (89,30- 316,99)	177,53 (132,37- 223,73)	438,53 (344,00- 749,51)	94,29 (68,19- 125,86)	5073,70 (1675,10- 8458,15)	829,21 (511,38- 1385,84)
14-е сутки / day 14							
Контроль Control	617,26 (546,59- 653,56)	319,73 (293,33- 339,04)	248,96 (193,01- 340,19) p = 0,002**	548,29 (472,21- 658,78)	75,60 (69,64- 83,95)	2920,27 (2582,69- 3089,07)	881,67 (769,84- 1098,27)
Пептиды ТБГ PSG peptides	857,83 (792,25- 1022,32) p < 0,0001**	399,67 (360,76- 428,67)	181,83 (175,94- 234,43) p = 0,027**	1061,53 (904,89- 1302,57) p < 0,001**	93,35 (83,41- 101,37)	4739,98 (4206,82- 5182,77)	1555,22 (1278,84- 1752,47) p = 0,027**
21-е сутки / day 21							
Контроль Control	692,76 (631,03- 734,69) p = 0,013**	492,19 (435,43- 520,97) p = 0,017**	222,54 (183,62- 292,97) p = 0,008**	727,56 (571,06- 829,50)	99,51 (92,09- 105,55)	5026,48 (4390,23- 6240,99) p = 0,028**	902,59 (808,52- 1067,55)
Пептиды ТБГ PSG peptides	487,20 (346,34- 616,02) p = 0,007*	356,65 (351,41- 386,44)	200,72 (163,91- 259,34) p = 0,036**	485,94 (380,95- 659,27) p = 0,017*	75,15 (67,76- 141,10) p = 0,006**	3393,67 (2513,18- 4483,97)	1081,64 (997,69- 1183,99)

Примечание. Указаны значения p (двухфакторный дисперсионный анализ) только < 0,05; * – статистически значимые различия внутри группы по отношению к 14-м суткам после аллотрансплантации (АТ); ** – к группе интактных крыс; # – к контролю.

Note. Only p < 0.05 (two-way ANOVA) are given; *, statistically significant differences within the group in relation to 14 days after allotransplantation (AT); **, to intact rats group; #, to control.

ТАБЛИЦА 2. КОНЦЕНТРАЦИИ ПРОТИВОВОСПАЛИТЕЛЬНЫХ ЦИТОКИНОВ СЫВОРОТКИ КРОВИ КРЫС WISTAR ПРИ АЛЛОГЕННОЙ ТРАНСПЛАНТАЦИИ И ВВЕДЕНИИ КОРОТКИХ ПЕПТИДОВ ТБГ В ЭКСПЕРИМЕНТЕ *IN VIVO*, пг/мл, Me ($Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$)

TABLE 2. CONCENTRATIONS OF ANTI-INFLAMMATORY CYTOKINES IN THE BLOOD SERUM OF WISTAR RATS AFTER ALLOGENEIC TRANSPLANTATION AND ADMINISTRATION OF SHORT PSG PEPTIDES IN THE EXPERIMENT *IN VIVO*, pg/mL, Me ($Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$)

	IL-4	IL-10	IL-13
Интактные Intact	158,53 (113,90-187,32)	135,83 (106,17-171,59)	60,56 (60,56-71,76)
3-и сутки / day 3			
Контроль Control	190,12 (143,92-230,72)	188,21 (160,79-219,27)	121,62 (97,65-199,82)
Пептиды ТБГ PSG peptides	229,69 (204,68-243,00)	239,00 (205,69-256,68) p = 0,041**	136,53 (114,30-149,30) p = 0,008***
7-е сутки / day 7			
Контроль Control	196,50 (184,21-233,34)	137,01 (129,89-170,20)	84,71 (81,02-129,86)
Пептиды ТБГ PSG peptides	223,81 (140,51-330,78)	82,4 (75,25-127,88)	170,45 (134,33-281,83)
14-е сутки / day 14			
Контроль Control	189,88 (141,54-216,30)	168,50 (153,00-178,61)	254,47 (228,50-269,59)
Пептиды ТБГ PSG peptides	353,39 (283,43-377,18) p = 0,024*	270,06 (249,69-277,18) p = 0,018* p = 0,004**	369,38 (306,82-458,18) p = 0,001*
21-е сутки / day 21			
Контроль Control	243,89 (225,50-258,79)	227,00 (205,18-240,60)	238,8 (221,08-253,42)
Пептиды ТБГ PSG peptides	229,6 (199,37-252,42)	200,89 (178,04-222,29)	199,68 (136,20-364,38) p = 0,031*

Примечание. Указаны значения p (двухфакторный дисперсионный анализ) только < 0,05; * – статистически значимые различия по отношению к группе интактных крыс; ** – внутри группы по отношению к 7-м суткам после АТ; *** – внутри группы по отношению к 14-м суткам после АТ.

Note. Only p < 0.05 (two-way ANOVA) are given; *, statistically significant differences in relation to the group of intact rats; **, within the group in relation to 7 days after AT; ***, within the group in relation to 14 days after AT.

от начала эксперимента, однако концентрации других регуляторных и ростовых факторов не изменялись по сравнению с группой интактных животных (табл. 3).

Статистически значимый эффект коротких пептидов ТБГ был обнаружен только в отношении IL-2. Его уровень повышался на 14-е сутки после АТ в опытной группе в сравнении с показателями животных контрольной группы.

Как уже было упомянуто, аллотрансплантация приводила к статистически значимому повышению концентрации IL-7 на 14-е и 21-е сутки после начала эксперимента по отношению к значениям интактных животных и по отношению к

3-м суткам, однако введение животным пептидов ТБГ отменяло этот эффект. Статистически значимых отличий между контрольной и опытной группами выявлено не было, однако можно наблюдать тенденцию к снижению уровня этого цитокина начиная с 7-х суток после АТ у животных, которым вводили исследуемые пептиды.

Концентрация IL-12 не изменялась в обеих группах животных на протяжении всего эксперимента.

В опытной группе животных наблюдалось достоверное по отношению к интактным крысам увеличение концентрации фактора роста эндотелия (VEGF) (табл. 3). Отметим, что в опытной

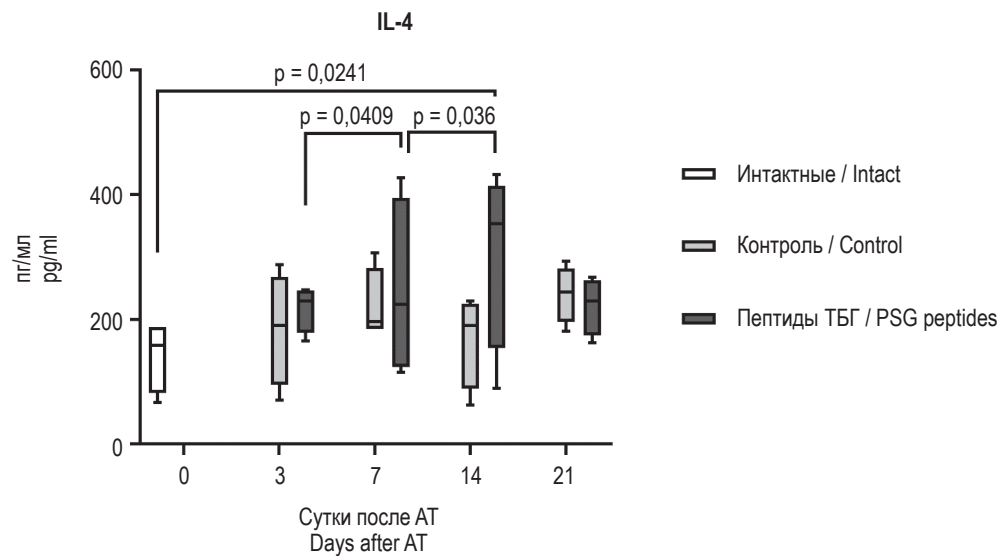


Рисунок 2. Концентрация IL-4 в сыворотке крови крыс при аллогенной трансплантации КМ и введении коротких пептидов ТБГ

Примечание. Представлены медианы, первый и третий квартили, минимальное и максимальное значения. Указаны значения $p < 0,05$ (двухфакторный дисперсионный анализ).

Figure 2. Concentration of IL-4 in the blood serum of rats after allogeneic BM transplantation and administration of short PSG peptides

Note. Medians, first and third quartiles, minimum and maximum values are presented. $p < 0.05$ values are given (two-way ANOVA).

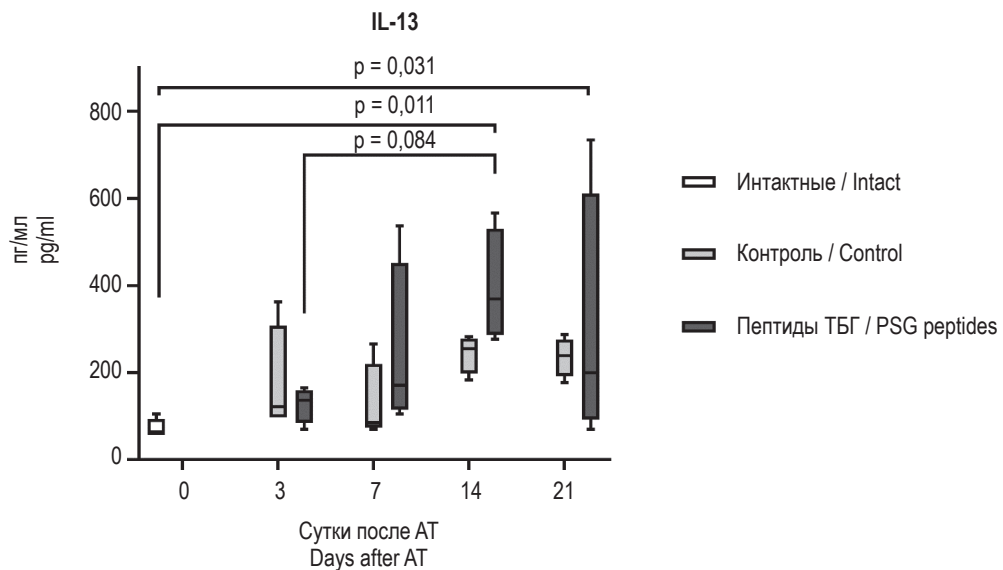


Рисунок 3. Концентрация IL-13 в сыворотке крови крыс при аллогенной трансплантации КМ и введении коротких пептидов ТБГ

Примечание. См. примечание к рисунку 2.

Figure 3. Concentration of IL-13 in the blood serum of rats after allogeneic BM transplantation and administration of short PSG peptides

Note. As for Figure 2.

группе животных концентрация этого фактора выше, чем в контрольной на протяжении всего эксперимента. Даже на 21-е сутки после введения клеток КМ под действием пептидов ТБГ уровень VEGF был выше, чем в интактной груп-

пе в среднем в 3,5 раза, тогда как в опытной — в 5,5 раза.

Концентрация М-CSF в опытной группе крыс повышалась на 14-е и 21-е сутки по отношению с 3 сутками после АТ. А уровни G-CSF и GM-CSF

ТАБЛИЦА 3. КОНЦЕНТРАЦИИ РЕГУЛЯТОРНЫХ ЦИТОКИНОВ И КОЛОНИЕСТИМУЛИРУЮЩИХ ФАКТОРОВ СЫВОРОТКИ КРОВИ КРЫС WISTAR ПРИ АЛЛОГЕННОЙ ТРАНСПЛАНТАЦИИ И ВВЕДЕНИИ КОРОТКИХ ПЕПТИДОВ ТБГ В ЭКСПЕРИМЕНТЕ *IN VIVO*, пг/мл, Ме ($Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$)

TABLE 3. CONCENTRATIONS OF REGULATORY CYTOKINES AND COLONY-STIMULATING FACTORS IN THE BLOOD SERUM OF WISTAR RATS AFTER ALLOGENEIC TRANSPLANTATION AND ADMINISTRATION OF SHORT PSG PEPTIDES IN THE EXPERIMENT *IN VIVO*, pg/mL, Me ($Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$)

	IL-2	IL-7	IL-12 (p70)	VEGF	M-CSF	G-CSF	GM-CSF	IL-5
Интактные Intact	904,71 (755,86-1057,86)	86,63 (81,30-90,01)	204,29 (173,28-244,76)	24,05 (22,21-28,36)	27,8 (19,20-38,37)	9,62 (8,03-11,08)	60,84 (56,98-64,76)	673,46 (592,61-725,21)
3-и сутки / day 3								
Контроль Control	922,59 (770,42-1314,60)	107,26 (88,20-132,87) p = 0,020** p = 0,021***	281,54 (260,64-350,76)	54,08 (39,33-70,22)	29,51 (27,14-40,25)	12,00 (10,94-16,11)	79,17 (66,06-99,49)	726,46 (668,22-802,87)
Пептиды ТБГ PSG peptides	837,41 (743,97-929,50) p = 0,0001**	158,46 (122,97-190,13)	465,41 (410,05-508,41)	104,67 (69,09-136,30)	31,14 (25,06-39,06) p = 0,037**	14,94 (12,17-16,85)	135,13 (94,05-171,59)	944,47 (924,91-957,41)
7-е сутки / day 7								
Контроль Control	1057,31 (1053,62-1325,34)	132,95 (116,99-148,40)	310,45 (233,67-385,32)	60,76 (43,10-80,69)	52,91 (47,08-63,51)	15,68 (12,50-17,65)	95,24 (74,37-122,18)	818,66 (724,99-1045,86)
Пептиды ТБГ PSG peptides	1153,01 (774,60-1561,11) p = 0,002**	101,26 (92,53-143,44)	377,08 (312,97-539,38)	92,66 (87,11-135,32) p = 0,019*	30,75 (30,11-45,49)	20,86 (14,17-26,02)	104,44 (78,89-144,46)	677,81 (436,03-990,59)
14-е сутки / day 14								
Контроль Control	1474,67 (1335,25-1700,13)	230,31 (180,61-312,61) p = 0,004*	310,31 (290,84-329,37)	67,30 (59,36-82,08)	62,67 (56,80-66s,29)	27,34 (21,82-36,72)	193,83 (151,29-263,74)	717,31 (637,78-758,62)
Пептиды ТБГ PSG peptides	2359,46 (2225,62-2789,35) P = 0,0002* p = 0,007*** p = 0,029#	171,25 (138,69-226,42)	453,12 (385,24-520,56)	119,59 (87,20-147,73)	65,76 (56,29-74,38) p = 0,044***	22,88 (19,33-27,65) p = 0,009*	151,95 (125,25-220,82) p = 0,004*	885,37 (754,66-949,04)
21-е сутки / day 21								
Контроль Control	1618,30 (1496,67-1716,85)	229,70 (186,66-305,26) p = 0,004*	506,92 (448,79-612,63)	78,00 (70,10-91,48)	29,25 (27,68-33,30)	21,29 (19,03-25,27)	161,21 (147,51-181,60)	900,35 (811,08-953,21)
Пептиды ТБГ PSG peptides	1420,77 (1251,04-1530,63)	188,16 (152,58-239,63)	391,53 (379,15-464,92)	132,92 (79,68-204,20) p = 0,003*	37,89 (29,85-40,61)	14,92 (12,46-26,04)	162,72 (116,44-246,31)	764,68 (749,31-819,23)

Примечание. Указаны значения p (двухфакторный дисперсионный анализ) только < 0,05; * – статистически значимые различия по отношению к группе интактных крыс; ** – внутри группы по отношению к 14-м суткам после АТ; *** – внутри группы по отношению к 21-м суткам после АТ; # – по отношению к контрольной группе.

Note. Only p values < 0.05 are given (two-way ANOVA); *, statistically significant differences in relation to the group of intact rats; **, within the group in relation to 14 days after AT; ***, within the group in relation to 21 days after AT; #, in relation to the control group.

ТАБЛИЦА 4. КОНЦЕНТРАЦИИ ХЕМОКИНОВ СЫВОРОТКИ КРОВИ КРЫС WISTAR ПРИ АЛЛОГЕННОЙ ТРАНСПЛАНТАЦИИ И ВВЕДЕНИИ КОРОТКИХ ПЕПТИДОВ ТБГ В ЭКСПЕРИМЕНТЕ *IN VIVO*, пг/мл, Ме (Q_{0,25}-Q_{0,75})

TABLE 4. SERUM CHEMOKINE CONCENTRATIONS IN WISTAR RATS AFTER ALLOGENEIC TRANSPLANTATION AND ADMINISTRATION OF SHORT PSG PEPTIDES IN THE EXPERIMENT *IN VIVO*, pg/mL, Me (Q_{0,25}-Q_{0,75})

	GRO/KC	MCP-1	MIP-1α	MIP-3α	RANTES
Интактные Intact	48,14 (47,11- 52,50)	1002,01 (965,46- 1064,72)	45,84 (40,14- 48,29)	25,30 (17,53- 34,23)	455,38 (396,46- 525,35)
3-и сутки / day 3					
Контроль Control	112,70 (103,84- 157,91)	1472,92 (1190,72- 2038,31)	36,17 (35,09- 46,56)	27,37 (25,73- 33,71)	881,89 (738,71- 1293,14)
Пептиды ТБГ PSG peptides	262,43 (243,08- 283,35) p = 0,0016*	2827,4 (2768,22- 2927,25) p < 0,0001* p = 0,0001** p = 0,0047*** p = 0,0133**** p = 0,0242#	86,39 (77,17- 96,53) p = 0,0405*	26,33 (23,05- 31,04)	2690,88 (2585,18- 2868,97) p < 0,0001* p = 0,0002*** p = 0,0001**** p = 0,0192#
7-е сутки / day 7					
Контроль Control	96,3 (66,97- 128,82)	1368,22 (1314,38- 1604,61)	43,52 (33,96- 54,34)	28,46 (21,04- 38,47)	574,09 (335,33- 1327,33)
Пептиды ТБГ PSG peptides	156,62 (72,41- 246,76)	821,49 (716,42- 1090,62)	55,59 (42,89- 69,09)	28,77 (25,42- 36,47)	1721,96 (1150,21- 2368,39) p = 0,0315**** p = 0,0104*
14-е сутки / day 14					
Контроль Control	119,32 (104,51- 145,83)	957,80 (811,65- 1055,12)	47,88 (39,27- 63,15)	27,84 (25,04- 29,48)	440,88 (355,64- 581,32)
Пептиды ТБГ PSG peptides	170,33 (129,71- 209,74) p = 0,0054*	1628,27 (1377,20- 1784,00)	43,75 (41,55- 54,46)	39,27 (34,50- 44,65)	939,14 (762,86- 1085,35)
21-е сутки / day 21					
Контроль Control	151,06 (135,35- 159,96)	1573,35 (1446,41- 1667,61)	70,98 (56,13- 95,80)	31,09 (28,71- 32,98)	964,5 (884,00- 1089,19)
Пептиды ТБГ PSG peptides	166,96 (143,79- 278,93) p = 0,0025*	1543,73 (1356,09- 1858,53)	45,69 (36,02- 67,92)	34,48 (28,49- 40,28)	607,28 (574,41- 669,80)

Примечание. Указаны значения p (двухфакторный дисперсионный анализ) только < 0,05; * – статистически значимые различия по отношению к группе интактных крыс; ** – внутри группы по отношению к 7-м суткам после АТ; *** – внутри группы по отношению к 14-м суткам после АТ; **** – внутри группы по отношению к 21-м суткам после АТ; # – по отношению к контрольной группе.

Note. Only p values < 0.05 are given (two-way ANOVA); *, statistically significant differences in relation to the group of intact rats; **, within the group in relation to 7 days after AT; ***, within the group in relation to 14 days after AT; **** – within the group in relation to 21 days after AT; #, in relation to the control group.

повышались в этой же группе животных на 14-е сутки после АТ и только по отношению к интактным крысам.

Изменения уровней хемокинов на фоне аллогенной трансплантации и введения коротких пептидов ТБГ

Введение клеток КМ животным не влияло на уровень хемокинов в сыворотке крови по сравнению с группой интактных животных (табл. 4). У животных на фоне аллотрансплантации КМ и введения пептидов ТБГ на 3-и сутки происходило статистически значимое повышение уровня таких хемокинов как MCP-1 и RANTES в сыворотке крови по отношению к контрольной группе. На фоне дальнейшего введения пептидов ТБГ концентрации этих хемокинов в сыворотке крови снижались на 7-е, 14-е и 21-е сутки от начала эксперимента. Интересно, что и при исследовании концентраций хемокинов на 21-е сутки от начала эксперимента тенденция к увеличению их уровня в контрольной группе сменялась на тенденцию к снижению в опытной группе.

Обсуждение

Известно, что воспалительные и иммунные реакции, как в норме, так и при патологии, являются результатом регуляторных взаимодействий многочисленных систем организма, связующим звеном между которыми являются цитокины (интерлейкины, колониестимулирующие и ростовые факторы, интерфероны, хемокины и др.) [41]. Обладая как провоспалительным, так и противовоспалительным действием, цитокины осуществляют регуляторную функцию не только внутри иммунной системы, но и обеспечивают многокомпонентные связи с нервной и эндокринной системами организма [36]. Следовательно, для раскрытия неизвестных на сегодняшний день патогенетических механизмов формирования воспалительного процесса в ходе аллотрансплантации и защитного эффекта пептидов ТБГ представляется важным изучение цитокинового профиля как интегрального показателя иммунного ответа.

В нашем исследовании введение суспензии КМ и реакция отторжения аллотрансплантата, подтвержденная морфологическими исследованиями (данные не приводятся), сопровождалась существенными изменениями цитокинового профиля (табл. 1, 2, 3, 4).

Повышение концентраций провоспалительных факторов на фоне аллотрансплантации (IL-1 β , IFN γ , IL-1 α и IL-18) (табл. 1) согласуется с данными литературы [35, 43].

Очевидно, что аллотрансплантация гематopoэтических стволовых клеток КМ животным приводит к РХПТ. В наших экспериментах мы

показали, что в группе животных, которым проводили аллотрансплантацию КМ наблюдалось увеличение концентрации провоспалительных факторов – IFN γ , IL-1 α , IL-1 β , IL-18 в сыворотке крови, что свидетельствует о запуске воспалительного ответа на трансплантат, т.е. его отторжения. Полученные нами данные соответствуют литературным, где показано увеличение концентраций IL-1, IFN γ , TNF α при отторжении трансплантата [35, 40, 43].

Введение пептидов ТБГ на фоне аллотрансплантации костного мозга приводило к статистически значимому повышению уровня IL-1 β по сравнению с контролем более чем в 2 раза на 3-и сутки после АТ. К концу эксперимента концентрация IL-1 β в опытной группе снижалась, статистически значимых отличий между группами обнаружено не было. Повышение IL-1 β , «классического» провоспалительного цитокина в условиях трансплантации нежелательно в силу его участия в процессах острого отторжения [34].

Интересно, что в отличие от IL-1 β , концентрации IFN γ , IL-6 и TNF α в группе животных, которым вводились пептиды ТБГ, возрастали только через 2 недели после начала эксперимента, а через три недели наблюдалась выраженная тенденция к снижению факторов воспаления, что может быть связано как с толерогенным действием коктейля пептидов ТБГ, так и, напротив, с усилением иммунного ответа в ранние сроки после АТ, приводящему к ускорению разрушения введенных аллогенных клеток. Ответить на вопрос, произошло ли усиление иммунной реакции в ранние сроки после АТ под влиянием коротких пептидов ТБГ помогут морфологические исследования гистологических препаратов места введения аллогенных клеток.

Аллотрансплантация клеток костного мозга животным статистически значимо не изменяла уровень противовоспалительных цитокинов, однако в группе животных, которым вводили пептиды ТБГ (опытная группа), наблюдалось статистически значимое увеличение концентраций IL-4, IL-10 и IL-13 на 14-е сутки, а IL-13 еще и на 21-е сутки после начала эксперимента по сравнению с интактными животными. Кроме того, по отношению к началу эксперимента уровни IL-4 и IL-13 в опытной группе нарастали к 14-м суткам после АТ, чего не наблюдалось в контрольной группе (рис. 2, 3). Известно, что эти цитокины рассматриваются как одни из важнейших факторов в индукции толерантности [11]. В нашем эксперименте уровень IL-13 на 14-е сутки после АТ на фоне введения пептидов ТБГ возрастал по сравнению с интактными животными в среднем в 6 раз, тогда как в контрольной группе – всего лишь в 4 раза. Именно этот цитокин, как было

показано, может продлевать выживаемость аллотрансплантата, ингибируя индукцию мРНК IL-12, TNF α и iNOS в дендритных клетках и/или макрофагах [11]. В целом, как и в случае с провоспалительными факторами, уровень противовоспалительных цитокинов в опытной группе (пептиды ТБГ) к 21-м суткам имел тенденцию к снижению. Хотя статистически значимых отличий между контрольной и опытной группами выявлено не было, обнаруженные эффекты пептидов ТБГ внушают оптимизм и задают вектор дальнейшим исследованиям.

Что касается регуляторных цитокинов и колониестимулирующих факторов, на фоне аллотрансплантации клеток костного мозга у животных наблюдалось повышение концентраций только G-CSF, GM-CSF на 14-е сутки от начала эксперимента. В опытной группе крыс к повышению этих двух колониестимулирующих факторов добавлялось и повышение M-CSF на 14-е и 21-е сутки по отношению с 3-ми сутками после АТ. Хотя статистически значимых отличий между в уровне M-CSF выявлено не было, надо помнить, что данный фактор продуцируется клетками моноцитарно-макрофагального ряда [14] и активированными Т-клетками [29], и его повышение может быть неблагоприятным с точки зрения выживания аллотрансплантата [22].

Статистически значимый эффект коротких пептидов ТБГ был обнаружен только в отношении IL-2. Его уровень повышался на 14-е сутки после АТ в опытной группе в сравнении с показателями животных контрольной группы. Известно, что IL-2 необходим для оптимального развития, выживания и функционирования Treg. В исследованиях на людях с аутоиммунными заболеваниями или РТПХ показано, что низкая доза IL-2 увеличивает количество эндогенных Treg [21], а использование этого цитокина в комплексе с донор-специфическими Treg приводит к продлению выживания кожного аллотрансплантата [30]. Таким образом, повышение концентрации IL-2 может быть благоприятным фактором, формирующим преимущественно супрессивный ответ на введение аллоантигенов.

Аллотрансплантация приводила к статистически значимому повышению концентрации IL-7 на 14-е и 21-е сутки после начала эксперимента по отношению к значениям интактных животных и по отношению к 3-м суткам, однако введение животным пептидов ТБГ отменяло этот эффект. Статистически значимых отличий между контрольной и опытной группами выявлено не было, однако можно наблюдать тенденцию к снижению уровня этого цитокина начиная с 7-х суток после АТ у животных, которым вводили исследуемые пептиды. IL-7 — это лимфопоэтиче-

ский фактор роста, который относится к короткоцепочечным цитокинам 1-го типа семейства гематопоэтина. IL-7 занимает особое положение среди других цитокинов из-за его уникальной функции в гематопоэзе, не дублирующейся другими факторами [9]. Поскольку IL-7 вовлечен в отторжение аллотрансплантата [32], снижение его концентрации в данном случае может быть благоприятным фактором.

В опытной группе животных наблюдалось достоверное по отношению к интактным крысам увеличение концентрации фактора роста эндотелия (VEGF). Отметим, что в опытной группе животных концентрация этого фактора выше, чем в контрольной на протяжении всего эксперимента. Даже на 21-е сутки после введения клеток КМ под действием пептидов ТБГ уровень VEGF был выше, чем в интактной группе в среднем в 3,5 раза, тогда как в опытной — в 5,5 раза, но статистически значимых отличий между этими группами выявлено не было. VEGF — сигнальный белок, вырабатываемый клетками для стимуляции васкулогенеза и ангиогенеза [12]. Известно, что одной из основных функций ТБГ является ангиогенная, опосредованная через повышение продукции VEGF [16]. Интересно, что пептиды ТБГ в нашем исследовании повышали уровень этого ростового фактора, возможно, в данном случае происходила своего рода имитация эффекта полноразмерной молекулы.

Аллотрансплантация не влияла на уровень хемокинов в сыворотке крови животных. Однако на фоне введения пептидов ТБГ на 3-и сутки происходило статистически значимое повышение уровня таких хемокинов, как MCP-1 и RANTES в сыворотке крови по отношению к контрольной группе. На фоне дальнейшего введения пептидов ТБГ концентрации этих хемокинов в сыворотке крови снижались на 7-е, 14-е и 21-е сутки от начала эксперимента. Интересно, что и при исследовании концентраций хемокинов на 21-е сутки от начала эксперимента тенденция к увеличению их уровня в контрольной группе сменялась на тенденцию к снижению в опытной группе. MCP-1 (CCL-2) и RANTES (CCL-5) относятся к группе CC-хемокинов и являются хемоаттрактантами макрофагов и Т-лимфоцитов, соответственно [10]. Известно, что они вовлечены в процесс острого и хронического воспаления, в том числе и при развитии иммунного ответа на аллогенный трансплантат [15, 33]. Таким образом, можно предположить, что первое введение пептидов ТБГ усилило воспалительные реакции в ответ на аллоантиген, но последующие введения препарата привели к нормализации уровней этих хемокинов.

Таким образом, пептиды ТБГ являются перспективным препаратом с иммунофармакологическими свойствами и нуждаются в дальнейших исследованиях для установления механизма их действия.

В результате проведенных исследований, мы показали, что пептиды ТБГ способны разнонаправленно модулировать цитокиновый профиль в динамике иммунного ответа на аллотрансплантат. Первые исследования биологической активности тетрапептидных фрагментов ТБГ были проведены Молдогазиевой Н.Т с коллегами (2012). В частности, было показано, что пептиды YECSE и YVCE в концентрации 10^{-7} М они способны снижать экспрессию активационного антигена CD95 на поверхности лимфоцитов у больных atopической бронхиальной астмой в 1,4 раза и у больных инфекционно-аллергическим миокардитом в 1,2 раза [2].

Важно отметить, что пептиды другого фетоплацентарного белка, хорионического гонадотропина (ХГ), также изучаются в контексте их иммунофармакологического потенциала [42]. Предполагается, что противовоспалительные эффекты ХГЧ обусловлены пептидами, расположенными в β -субъединице ХГЧ, такими как LQGV, AQGV и LAGV [37]. На модели с использованием экспериментальных животных было показано противовоспалительное действие этих пептидов, которое заключалось в снижении уровня провоспалительных цитокинов [20, 37]. Препарат EA-230 – (синтетический линейный тетрапептид AQGV) в данный момент проходит клинические испытания по изучению фармакокинетики, безопасности и переносимости A-230 у здоровых субъектов, используя различные стратегии введения [38]. В целом, пептиды ХГ перспективны в терапии воспалительных заболеваний, отдельно или в сочетании с другими

противовоспалительными средствами [42]. Другой фетоплацентарный белок – альфа-фетопро-теин (АФП) также имеет потенциал как источник пептидов с терапевтическим эффектом [24, 25]. Помимо этого, довольно подробно изучены иммуномодулирующие эффекты пептидов активного центра GM-CSF, на основе которых создан препарат Ацеграм [1].

Невзирая на активное изучение коротких пептидов различных белков, пока мы не можем считать, что пептиды воспроизводят эффект целой молекулы. Так, наши исследования влияния нативного ТБГ на продукцию цитокинов и хемокинов интактными мононуклеарными клетками в условиях *in vitro* показали, что ТБГ подавлял продукцию IL-6, IL-8, IL-17, IFN γ , TNF α , IL-9, IL-13, G-CSF, GM-CSF, MIP-1 α , MIP-1 β , MCP-1, одновременно стимулируя продукцию VEGF и IL-12 (p70) [4]. В ситуации *in vivo*, пептиды ТБГ индуцировали повышение IFN γ , IL-6, TNF α , IL-4, IL-13, IL-2, M-CSF, MCP-1 и RANTES, однако надо понимать, что повышение происходило на фоне аллогенной трансплантации и в динамике наблюдения их уровень снижался в сравнении с контрольной группой.

Заключение

В целом показано, что применение пептидов ТБГ в процессе развития иммунного ответа на аллотрансплантат ускоряет нормализацию концентраций подавляющего большинства исследованных цитокинов, что свидетельствует об иммунофармакологическом потенциале этих пептидов. Полученные данные могут использоваться для разработки научно обоснованных технологий коррекции дисбаланса иммунитета, особенно для аутоиммунных заболеваний в виде фармакологического препарата на основе исследуемых пептидов.

Список литературы / References

1. Зурочка А.В., Гриценко В.А., Зурочка В.А., Добрынина М.А., Черешнев В.А. Гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор (ГМ-КСФ) и его синтетические аналоги: иммунологические эффекты и клиническое применение. Екатеринбург: УрО РАН, 2021. 288 с. [Zurochka A.V., Gritsenko V.A., Zurochka V.A., Dobrynina M.A., Chereshev V.A. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) and its synthetic analogues: immunobiological effects and clinical application. 2021]. Yekaterinburg: Ural Branch of the RAS, 2021. 288 p.
2. Молдогазиева Н.Т., Терентьев А.А., Антонов М.Ю., Казимирский А.Н., Шайтан К.В. Корреляция между биологической активностью и конформационно-динамическими свойствами тетра- и пентапептидных фрагментов фетоплацентарных белков // Биохимия, 2012. Т. 77, № 5. С. 583-602. [Moldogazieva N.T., Terentiev A.A., Antonov M.Yu., Kazimirsky A.N., Shaitan K.V. Correlation between biological activity and conformational-dynamic properties of tetra- and pentapeptides derived from fetoplacental proteins. *Biokhimiya = Biochemistry*, 2012, Vol. 77, no. 5, pp. 583-602. (In Russ.)]
3. Посисеева Л.В., Назаров С.Б., Татаринов Ю.С. Трофобласт-специфический бета-гликопротеин в акушерстве и гинекологии. Иваново: Иваново, 2004. 240 с. [Posiseeva L.V., Nazarov S.B., Tatarinov Yu.S. Trophoblast-specific beta-glycoprotein in obstetrics and gynecology]. Ivanovo: Ivanovo Publishing, 2004. 240 p.
4. Раев М.Б., Литвинова Л.С., Юрова К.А., Хазиахматова О.Г., Дунец Н.А., Тимганова В.П., Бочкова М.С., Храмов П.В., Заморина С.А. Роль трофобластического β 1-гликопротеина в регуляции цитокино-

вого и хемокинового профиля интактных мононуклеарных клеток // Доклады академии наук, 2017. Т. 475, № 3. С. 349-352. [Raev M.B., Litvinova L.S., Yurova K.A., Khaziakhmatova O.G., Dunets N.A., Timganova V.P., Bochkova M.S., Khrantsov P.V., Zamorina S.A. The role of trophoblastic β 1-glycoprotein in the regulation of the cytokine and chemokine profile of intact mononuclear cells. *Doklady akademii nauk = Reports of the Academy of Sciences*, 2017, Vol. 475, no. 3, pp. 349-352. (In Russ.)]

5. Тимганова В.П., Бочкова М.С., Раев М.Б., Храпцов П.В., Заморина С.А. Иммунорегуляторный потенциал трофобластического β 1-гликопротеина // Медицинская иммунология, 2021. Т. 23, № 3. С. 455-468. [Timganova V.P., Bochkova M.S., Rayev M.B., Khrantsov P.V., Zamorina S.A. Immunoregulatory potential of pregnancy-specific β 1-glycoprotein. *Meditsinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2021, Vol. 23, no. 3, pp. 455-468. (In Russ.)] doi: 10.15789/1563-0625-IPO-2170.

6. Angell Y., Holford M., Moos W.H. Building on success: a bright future for peptide therapeutics. *Protein. Pept. Lett.*, 2018, Vol. 25, no. 12, pp. 1044-1050.

7. Blois S.M., Sulkowski G., Tirado-González I., Warren J., Freitag N., Klapp B., Rifkin D., Fuss I., Strober W., Dveksler G. Pregnancy-specific glycoprotein 1 (PSG1) activates TGF- β and prevents dextran sodium sulfate (DSS)-induced colitis in mice. *Mucosal Immunol.*, 2014, Vol. 7, pp. 348-358.

8. Boieri M., Shah P., Dressel R., Inngjerdigen M. The role of animal models in the study of hematopoietic stem cell transplantation and GvHD: A historical overview. *Front. Immunol.*, 2016, Vol. 7, 333. doi: 10.3389/fimmu.2016.00333.

9. Chen D., Tang T.-X., Deng H., Yang X.-P., Tang Z.-H. Interleukin-7 Biology and its effects on immune cells: mediator of generation, differentiation, survival, and homeostasis. *Front. Immunol.*, 2021, Vol. 12, 747324. doi: 10.3389/fimmu.2021.747324.

10. Conti P., DiGioacchino M. MCP-1 and RANTES are mediators of acute and chronic inflammation. *Allergy Asthma Proc.*, 2001, Vol. 22, no. 3, pp. 133-137.

11. Davidson C., Verma N.D., Robinson C.M., Plain K.M., Tran G.T., Hodgkinson S.J., Hall B.M. IL-13 prolongs allograft survival: association with inhibition of macrophage cytokine activation. *Transpl. Immunol.*, 2007, Vol. 17, no. 3, pp. 178-186.

12. Duffy A.M., Bouchier-Hayes D.J., Harmey J.H. Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) and its role in non-endothelial cells: autocrine signalling by VEGF. In: Madame Curie bioscience database [Internet]. Austin (TX): Landes Bioscience, 2000-2013.

13. Falcón C.R., Martínez F.F., Carranza F., Cervi L., Motrán C.C. *In vivo* expression of recombinant pregnancy-specific glycoprotein 1a inhibits the symptoms of collagen-induced arthritis. *Am. J. Reprod. Immunol.*, 2014, Vol. 72, no. 6, pp. 527-533.

14. Fixe P., Praloran V. M-CSF. Haematopoietic growth factor or inflammatory cytokine. *Cytokine*, 1998, Vol. 10, no. 1, pp. 32-37.

15. Fleury S., Li J., Simeoni E., Fiorini E., von Segesser L.K., Kappenberger L., Vassalli G. Gene transfer of RANTES and MCP-1 chemokine antagonists prolongs cardiac allograft survival. *Gene Ther.*, 2006, Vol. 13, pp. 1104-1109.

16. Ha C.T., Wu J.A., Irmak S., Lisboa F.A., Dizon A.M., Warren J.W., Ergun S., Dveksler G.S. Human pregnancy specific beta-1-glycoprotein 1 (PSG1) has a potential role in placental vascular morphogenesis. *Biol. Reprod.*, 2010, Vol. 83, no. 1, pp. 27-35.

17. Hardt F., Claësson M.H. Graft-versus-host reactions mediated by spleen cells from amyloidotic and nonamyloidotic mice. *Transplantation*, 1971, Vol. 12, no. 1, pp. 36-39.

18. Henden A.S., Hill G.R. Cytokines in graft-versus-host disease. *J. Immunol.*, 2015, Vol. 194, no. 10, pp. 4604-4612.

19. Jones K., Bryant S., Luo J., Kiesler P., Koontz S., Warren J., Malech H., Kang E., Dveksler G. Recombinant pregnancy-specific glycoprotein 1 has a protective role in a murine model of acute graft-versus-host disease. *Biol. Blood Marrow Transplant.*, 2019, Vol. 25, no. 2, pp. 193-203.

20. Khan N.A., Susa D., van den Berg J.W., Huisman M., Ameling M.H., van den Engel S., Roest H.P., IJzermans J.N.M., Dik W.A., Benner R., de Bruin R.W.F. Amelioration of renal ischaemia-reperfusion injury by synthetic oligopeptides related to human chorionic gonadotropin. *Nephrol. Dial. Transplant.*, 2009, Vol. 24, no. 9, pp. 2701-2708.

21. Koreth J., Matsuo K., Kim H.T., McDonough S.M., Bindra B., Alyea E.P. 3rd, Armand P., Cutler C., Ho V.T., Treister N.S., Bienfang D.C., Prasad S., Tzachanis D., Joyce R.M., Avigan D.E., Antin J.H., Ritz J., Soiffer R.J. Interleukin-2 and regulatory T cells in graft-versus-host disease. *N. Engl. J. Med.*, 2011, Vol. 365, no. 22, pp. 2055-2066.

22. Le Meur Y., Leprivey-Lorgeot V., Mons S., José M., Dantal J., Lemauff B., Aldigier J.-C., Leroux-Robert C., Praloran V. Serum levels of macrophage-colony stimulating factor (M-CSF): a marker of kidney allograft rejection. *Nephrol. Dial. Transplant.*, 2004, Vol. 19, Iss. 7, pp. 1862-1865.

23. Liu L., Zhang Z.-C. Short linear motifs (SLiMs): New functionally diverse modules regulating protein-protein interactions. *Prog. Biochem. Biophys.*, 2017, Vol. 44, no. 2, pp. 129-138.

24. Mesfin F.B., Andersen T.T., Jacobson H.I., Zhu S., Bennett J.A. Development of a synthetic cyclized peptide derived from alpha-fetoprotein that prevents the growth of human breast cancer. *J. Pept. Res.*, 2001, Vol. 58, no. 3, pp. 246-256.

25. Mesfin F.B., Bennett J.A., Jacobson H.I., Zhu S., Andersen T.T. Alpha-fetoprotein-derived antiestrogenic octapeptide. *Biochim. Biophys. Acta.*, 2000, Vol. 1501, no. 1, pp. 33-43.

26. Moldogazieva N.T., Mokhosoev I.M., Terentiev A.A. Pregnancy-Specific β 1-Glycoproteins: combined biomarker roles, structure/function relationships and implications for drug design. *Curr. Med. Chem.*, 2017, Vol. 24, no. 3, pp. 245-267.
27. Ogonek J., Juric M.K., Ghimire S., Varanasi P.R., Holler E., Greinix H., Weissinger E. Immune reconstitution after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Front. Immunol.*, 2016. Vol. 7, 507. doi: 10.3389/fimmu.2016.00507.
28. Persico M., Di Dato A., Orteca N., Fattorusso C., Novellino E., Andreoli M., Ferlini C. From protein communication to drug discovery. *Curr. Top. Med. Chem.*, 2015, Vol. 15, no. 20, pp. 2019-2031.
29. Praloran V., Gascan H., Papin S., Chevalier S., Trossaert M., Boursier M.C. Inductible production of macrophage colony stimulating factor (CSF-1) by malignant and normal human T cells. *Leukemia*, 1990, Vol. 4, pp. 411-414.
30. Ratnasothy K., Jacob J., Tung S., Boardman D., Lechler R.I., Sanchez-Fueyo A., Martinez-Llordella M., Lombardi G. IL-2 therapy preferentially expands adoptively transferred donor-specific Tregs improving skin allograft survival. *Am. J. Transplant.*, 2019, Vol. 19, no. 7, pp. 2092-2100.
31. Ryan A.J., Squires S., Strutt H.L., Johnson R.T. Camptothecin cytotoxicity in mammalian cells is associated with the induction of persistent double strand breaks in replicating DNA. *Nucleic. Acids Res.*, 1991, Vol. 19, no. 12, pp. 3295-3300.
32. Schreiber M., Weigelt M., Karasinsky A., Anastassiadis K., Schallenberg S., Petzold C., Bonifacio E., Kretschmer K., Hommel A. Inducible IL-7 hyperexpression influences lymphocyte homeostasis and function and increases allograft rejection. *Front. Immunol.*, 2019, Vol. 10, 742. doi: 10.3389/fimmu.2019.00742.
33. Sekine Y., Yasufuku K., Heidler K.M., Cummings O.W., van Rooijen N., Fujisawa T., Brown J., Wilkes D.S. Monocyte chemoattractant protein-1 and RANTES are chemotactic for graft infiltrating lymphocytes during acute lung allograft rejection. *Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.*, 2000, Vol. 23, no. 6, pp. 719-726.
34. Striz I. Cytokines of the IL-1 family: recognized targets in chronic inflammation underrated in organ transplantations. *Clin. Sci.*, 2017, Vol. 131, no. 17, pp. 2241-2256.
35. Sun K., Li M., Sayers T.J., Welniak L.A., Murphy W.J. Differential effects of donor T-cell cytokines on outcome with continuous bortezomib administration after allogeneic bone marrow transplantation. *Blood*, 2008, Vol. 112, no. 4, pp. 1522-1529.
36. Turner M.D., Nedjai B., Hurst T., Pennington D.J. Cytokines and chemokines: At the crossroads of cell signalling and inflammatory disease. *Biochim. Biophys. Acta.*, 2014, Vol. 43, no. 11, pp. 2563-2582.
37. van den Berg H.R., Khan N.A., van der Zee M., Bonthuis F., IJzermans J.N., Dik W.A., Boardman D., Lechler R.I., Sanchez-Fueyo A., Martinez-Llordella M., Lombardi G. Synthetic oligopeptides related to the β -Subunit of human chorionic gonadotropin attenuate inflammation and liver damage after (trauma) hemorrhagic shock and resuscitation. *Shock*, 2009, Vol. 31, no. 3, pp. 285-291.
38. van Groenendael R., Beunders R., Hofland J., Morshuis W.J., Kox M., van Eijk L.T., Pickkers P. The safety, tolerability, and effects on the systemic inflammatory response and renal function of the human chorionic gonadotropin hormone-derivative EA-230 following on-pump cardiac surgery (The EASI Study): protocol for a randomized, double-blind, placebo-controlled phase 2 Study. *JMIR Res. Protoc.*, 2019, Vol. 8, no. 2, e11441. doi: 10.2196/11441.
39. Vogelsang G.B., Hess A.D., Friedman K.J., Santos G.W. Therapy of chronic Graft-v-Host disease in a rat model. *Blood*, 1989, Vol. 74, Iss. 1, pp. 507-511. doi: 10.1182/blood.V74.1.507.507.
40. Weigt S.S., Palchevskiy V., Belperio J.A. Inflammasomes and IL-1 biology in the pathogenesis of allograft dysfunction. *J. Clin. Invest.*, 2017, Vol. 127, no. 6, pp. 2022-2029.
41. Wu J., Xie A., Chen W. Cytokine regulation of immune tolerance. *Burns Trauma*, 2014, Vol. 2, no. 1, pp. 11-17.
42. Yoo S.K., Mehdi S.F., Pusapati S., Mathur N., Anipindi M., Lunenfeld B., Lowell B., Yang H., Metz C.N., Khan S.A., Leroith D., Roth J. Human chorionic gonadotropin and related peptides: candidate anti-inflammatory therapy in early stages of sepsis. *Front. Immunol.*, 2021, Vol. 12, 714177. doi: 10.3389/fimmu.2021.714177.
43. Yue X.T., Wei X.X., Jia W.H., Mao H., Chen W.R., Gu H.H., Wu J.Q., Li D.P., Xu K.L., Huang Y.H. Effects of regulatory dendritic cells on graft-versus-host disease and graft-versus-leukemia in mice after allogeneic bone marrow transplantation. *Int. J. Clin. Exp.*, 2018, Vol. 11, no. 8, pp. 7800-7810.

Авторы:

Тимганова В.П. — к.б.н., научный сотрудник лаборатории экологической иммунологии ФГБУН «Институт экологии и генетики микроорганизмов Уральского отделения Российской академии наук», г. Пермь, Россия

Бочкова М.С. — к.б.н., научный сотрудник лаборатории экологической иммунологии ФГБУН «Институт экологии и генетики микроорганизмов Уральского отделения Российской академии наук»; старший преподаватель кафедры микробиологии и иммунологии ФГБОУ ВО «Пермский государственный национальный исследовательский университет», г. Пермь, Россия

Authors:

Timganova V.P., PhD (Biology), Research Associate, Laboratory of Ecological Immunology, Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms, Ural Branch, Russian Academy of Sciences, Perm, Russian Federation

Bochkova M.S., PhD (Biology), Research Associate, Laboratory of Ecological Immunology, Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms, Ural Branch, Russian Academy of Sciences; Senior Lecturer, Department of Microbiology and Immunology, Perm State National Research University, Perm, Russian Federation

Шардина К.Ю. — младший научный сотрудник лаборатории молекулярной иммунологии ФГБУН «Институт экологии и генетики микроорганизмов Уральского отделения Российской академии наук», г. Пермь, Россия

Узвйук С.В. — младший научный сотрудник лаборатории молекулярной иммунологии ФГБУН «Институт экологии и генетики микроорганизмов Уральского отделения Российской академии наук», г. Пермь, Россия

Гутина Е.В. — студентка кафедры микробиологии и иммунологии ФГБОУ ВО «Пермский государственный национальный исследовательский университет», г. Пермь, Россия

Раев М.Б. — д.б.н., ведущий научный сотрудник лаборатории экологической иммунологии ФГБУН «Институт экологии и генетики микроорганизмов Уральского отделения Российской академии наук»; профессор кафедры микробиологии и иммунологии ФГБОУ ВО «Пермский государственный национальный исследовательский университет», г. Пермь, Россия

Любимов А.В. — научный руководитель лаборатории токсикологических исследований департамента фармакологии, Университет Иллинойса, Чикаго, США

Заморина С.А. — д.б.н., ведущий научный сотрудник лаборатории экологической иммунологии ФГБУН «Институт экологии и генетики микроорганизмов Уральского отделения Российской академии наук»; профессор кафедры микробиологии и иммунологии ФГБОУ ВО «Пермский государственный национальный исследовательский университет», г. Пермь, Россия

Shardina K. Yu., Junior Research Associate, Laboratory of Molecular Immunology, Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms, Ural Branch, Russian Academy of Sciences, Perm, Russian Federation

Uzhviyuk S. V., Junior Research Associate, Laboratory of Molecular Immunology, Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms, Ural Branch, Russian Academy of Sciences, Perm, Russian Federation

Gutina E. V., Student, Department of Microbiology and Immunology, Perm State National Research University, Perm, Russian Federation

Rayev M. B., PhD, MD (Biology), Leading Research Associate, Laboratory of Ecological Immunology, Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms, Ural Branch, Russian Academy of Sciences; Professor, Department of Microbiology and Immunology, Perm State National Research University, Perm, Russian Federation

Lyubimov A. V., Director for Research, Toxicology Laboratory, Department of Pharmacology, University of Illinois, Chicago, USA

Zamorina S. A., PhD, MD (Biology), Leading Research Associate, Laboratory of Ecological Immunology, Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms, Ural Branch, Russian Academy of Sciences; Professor, Department of Microbiology and Immunology, Perm State National Research University, Perm, Russian Federation

Поступила 27.12.2021
Отправлена на доработку 13.02.2022
Принята к печати 18.02.2022

Received 27.12.2021
Revision received 13.02.2022
Accepted 18.02.2022