

УДК 615.361

ТРЕКРЕЗАН КАК МОДУЛЯТОР ГЕМО- И ИММУНОПОЭЗА© 2003 г. **О. П. Колесникова, О. Т. Кудаева, Т. Г. Сухенко,
В. Л. Лимонов, В. А. Козлов, А. Н. Мирскова, академик М. Г. Воронков**

Поступило 02.04.2003 г.

Среди общепризнанных иммуноактивных препаратов отсутствуют синтетические средства из производных арилгетероалканкарбоновых кислот. В то же время эти соединения, проявляющие уникальную биологическую активность, перспективны для создания иммуномодуляторов нового поколения. Так, трис(2-гидроксиэтил)аммоний 2-метилфеноксиацетат (трекрезан) уже проявил себя как адаптоген широкого спектра действия [1]. Этот препарат и его близкие структурные аналоги обладают выраженной канцеростатической и протекто-адаптационной активностью [2]. Наряду с этим известна способность трекрезана стимулировать IgM-ответ (иммуноглобулины М) у интактных низко- и высокоотвечающих на тимусзависимый антиген линий мышей [3].

Мы впервые исследовали влияние трекрезана на гемо- и иммунопоэз на экспериментальных моделях иммунопатологии. Одним из перспективных подходов иммунокоррекции является воздействие данного препарата на пролиферацию, дифференцировку и самоподдержание ранних гемопоэтических предшественников. Элементы иммунной и кроветворной систем, имея единого предшественника – стволовую кроветворную клетку – и тесно взаимодействуя между собой, модулируют как иммуно-, так и гемопоэз [4].

Нами использовались экспериментальные модели, созданные с помощью реакции трансплантат против хозяина (РТПХ), при определенных генетических различиях донора и реципиента в аллогенной (C57BL/6 → BALB/c → BALB/c) и полуаллогенной системах родитель → F1 – реципиент (DBA/2 → B6D2F1). РТПХ-индуцированные модели расстройств иммунитета отражают разные варианты сочетанных нарушений эритро- и иммунопоэза: иммунодефицита в сочетании с гемолитической анемией и иммунодефицита в сочетании с гемолитической анемией и иммунокомплексным гломерулонефритом, иммунодефицита в сочетании с гипопластической анемией [5].

Ранее сообщалось о дисфункции эритропоэза как об одном из звеньев в формировании патологии иммунной системы в различных экспериментальных моделях: мыши линии NZB (аутоиммунные расстройства), мыши линии AKR (лимфо-пролиферативные заболевания), мыши в возрасте 24–28 мес (старческий иммунодефицит) [6,7]. Восстановление пролиферативной активности ранних гемопоэтических предшественников с помощью ингибиторов гемопоэза приводит к нормализации иммунитета при аутоиммунных, иммунодефицитных и других нарушениях [8].

В нашем исследовании РТПХ-индуцированную модель иммунодефицита и анемии у мышей-самок (C57BL/6хDBA/2)F1 (B6D2F1) вызывали двукратным с недельным интервалом внутривенным введением $50 \cdot 10^6$ лимфоидных клеток от самок родительской линии DBA/2. Количество IgM-антителообразующих клеток (АОК) в селезенке мышей *in vivo* оценивали на 4-е сутки после внутривенной иммунизации $2 \cdot 10^8$ эритроцитами барана по количеству локальных зон гемолиза. Гематокрит определяли микроцентрифугированием на МЦГ-8, гемоглобин – спектрофотометрически при λ 405 нм. Количество гемоглобина в крови мышей рассчитывали по калибровочной кривой. Количество ретикулоцитов устанавливали в мазке крови, окрашенной азуром II, эритрокариоцитов – в мазке костного мозга, окрашенного азуром II – эозином. Количество эритроидных бурсообразующих единиц (БОЕэ) в культуре костного мозга оценивали по известной методике [9]. Количество БОЕэ рассчитывалось на 10^5 клеток костного мозга (ККМ). Содержание белка в моче определяли калориметрически с красителем Kumsai brilliant blue на приборе Titertec Multiskan при λ 570 нм. В опытах использовали мышей со стойкой протеинурией (белок в моче определяли неоднократно).

У мышей B6D2F1 с РТПХ-индуцированным иммунодефицитом наблюдается дисфункция эритропоэза, проявляющаяся анемией в периферической крови (снижение гемоглобина и гематокрита) и увеличением количества ранних и поздних предшественников эритропоэза (БОЕэ → эритрокариоциты → ретикулоциты). Гемолити-

Таблица 1. Влияние трекрезана на эритро- и иммунопоэз у мышей B6D2F1 с иммунодефицитом и анемией

Исследуемый показатель	Контроль	Иммуно-дефицит	Иммунодефицит + трекрезан
Число IgM-АОК/селезенку	45600	12640*	30826 [#]
Гемоглобин, г/л	189.0	165.6*	191.6 [#]
Гематокрит, %	49.4	45.9*	47.1 [#]
Ретикулоциты, ‰	10.3	15.9*	10.0 [#]
Эритрокарициты, %	28.5	34.4*	27.8 [#]
БОЕ э/10 ⁵ ККМ	6.7	20.2*	12.7 [#]

* Достоверно относительно интактных мышей, [#] достоверно относительно мышей с иммунодефицитом (по непараметрическим критериям статистики).

ческая анемия у мышей B6D2F1 с иммуносупрессией сопровождается гиперплазией эритрона с увеличением количества гемопоэтических предшественников БОЕэ, КОЕс-5, КОЕс-8. Поэтому исследовали влияние курсового введения (6 раз через день) трекрезана в дозе 50мг/кг на выраженность анемии, количество ранних предшественников эритропоэза и величину первичного гуморального иммунного ответа (IgM-ответ) (табл. 1). Данные этой таблицы свидетельствуют, что курсовое введение трекрезана приводит к коррекции иммуносупрессии (достоверное увеличение количества IgM-АОК в селезенке) и анемии (достоверное повышение гемоглобина и гематокрита в крови). Нормализуются поздние эритроидные предшественники в крови (достоверное снижение числа ретикулоцитов) и ранние ядродержащие эритроидные предшественники в костном мозге (достоверное снижение числа эритрокарицитов), табл. 1.

Из табл. 1 также следует, что введение трекрезана тормозит бурстобразование в культуре костного мозга от этих мышей *in vitro* (достоверное снижение количества БОЕэ/10⁵ клеток костного мозга). Таким образом, трекрезан, устраняя анемию, снижает гиперплазию эритрона у мышей с иммуносупрессией, начиная с ранних костно-мозговых предшественников – с уровня БОЕэ. Такое его действие на эритропоэз может быть связано как с прямым влиянием на клеточные элементы эритроидного ростка, так и с опосредованным, через цитокины. В связи с этим мы оценивали влияние трекрезана на секрецию ИЛ-1 перитонеальными макрофагами мышей B6D2F1 с РТПХ-индуцированным иммунодефицитом. Установлено, что трекрезан снижает как спонтанную (на 38%), так и ЛПС-индуцированную (на 54%) продукцию ИЛ-1 у больных мышей. Нами найдено, что спонтанная продукция ИЛ-1 усилена у мышей B6D2F с иммунодефицитом. По данным [10, 11] ИЛ-1 стимулирует рост БОЕэ, а также, усиливая активность Th2, способствует увеличению продукции антиэритроцитарных аутоантител и развитию гемолитической анемии. Это указывает на

то, что уменьшение секреции ИЛ-1 под влиянием трекрезана является одной из причин устранения анемии у мышей с РТПХ-индуцированным иммунодефицитом. Наряду с этим трекрезан в разных дозах и при одно- или трехкратном введении интактным мышам-донорам стволовых кроветворных клеток (СКК) существенно подавлял пролиферативную активность СКК костного мозга и селезенки, образующих колонии на 8-е сутки. Внесение трекрезана в культуру костного мозга интактных мышей *in vitro* приводит к ингибции бурстобразования (БОЕэ), т.е. выявляется его непосредственное влияние на ранние костно-мозговые предшественники эритропоэза.

Как известно, ИЛ-1, являясь провоспалительным цитокином, играет большую роль в развитии иммунного воспаления в почках [12]. Учитывая, что у мышей B6D2F1 с иммунодефицитом, анемией и иммунокомплексным гломерулонефритом секреция ИЛ-1 повышена, снижение секреции ИЛ-1 под влиянием трекрезана должно уменьшать поражение почек.

Мышам B6D2F1/с иммунокомплексным гломерулонефритом проведено курсовое введение трекрезана в дозе 5мг/кг в течение 40 дней через день (15 инъекций). У одних и тех же мышей ежедневно в динамике отслеживали уровень протеинурии. У 100% мышей до лечения выявлена протеинурия (в среднем содержание белка в моче 9.8 мг/мл). Сразу после окончания лечения у 90% мышей уровень белка снизился и в среднем составлял 5.9 мг/мл, через 2 мес после окончания лечения у 90% мышей содержание белка в моче снизилось по сравнению с исходными данными и в среднем в группе составляло 4.7 мг/мл, что достоверно ниже по сравнению с показателями протеинурии до лечения.

РТПХ-индуцированную модель иммунодефицита у мышей-самцов BALB/c вызывали серией переносов сингенных клеток селезенки, иммунных к аллоантигенам [13]. Использовались мыши на 5–6-м мес заболевания. Началом заболевания был условно принят момент индукции РТПХ (последний перенос вторичным реципиентам). Кон-

тролем являлись интактные самцы BALB/c того же возраста, что и в опыте. Курсовое введение трекрезана мышам BALB/c с РТПХ-индуцированным иммунодефицитом в дозе 5 мг/кг в течение месяца через день (12 инъекций) увеличивает количество ядросодержащих клеток в крови сразу после окончания курса инъекций. У контрольных мышей в крови содержалось $9.2 \cdot 10^3$ клеток/мл, а у мышей после курса трекрезана – $17.42 \cdot 10^3$ клеток/мл. Через 4 мес у нелеченых животных количество ядросодержащих клеток снизилось до $6.9 \cdot 10^3$ клеток/мл, у леченых трекрезаном – в крови содержалось $13.6 \cdot 10^3$ клеток/мл. Это свидетельствует о стойком стимулирующем эффекте трекрезана на лейкопоэз.

Формирование расстройств иммунитета – иммунодефицитов, аутоиммунных нарушений сопровождается сдвигами не только в иммунной системе, но и в кроветворной, связанной с изменением пролиферации стволовой кроветворной клетки, колониеобразующей активности гемопоэтических предшественников эритроидного и гранулоцитарно-макрофагального рядов. Полученные нами данные свидетельствуют, что трекрезан, обладает сочетанными гемо- и иммунопоэзмодулирующими свойствами, что открывает новый класс иммуномодуляторов, регулирующих расстройства иммунитета.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Регистр лекарственных средств России. М. Информхим, 1995. С. 487.
2. Воронков М.Г., Мирскова А.Н., Левковская Г.Г. // ДАН. 2002. Т. 385. № 3. С. 411–414.
3. Ширинский В.С., Колесникова О.П., Кудяева О.Т. и др. // Эксперим. и клин. фармакологии. 1993. Т. 56. № 3. С. 42–45.
4. Козлов В.А., Журавкин И.Н., Цырлова И.Г. Стволовая кроветворная клетка и иммунный ответ. Новосибирск: Наука, 1982. С. 222.
5. Колесникова О.П. РТПХ-индуцированные расстройства иммунитета как экспериментальные модели для поиска новых биологически активных соединений. Автореф. докт. дис. ... д-ра биол. наук. Новосибирск: ГУ-НИИ клин. иммунологии СО РАН, 2000. С. 39.
6. Цырлова И.Г. // Онтогенез. 1991. Т. 22. С. 152–158.
7. Цырлова И.Г., Лисуков И.А., Гайдуль К.В. и др. // Гематология и трансфузиология. 1987. Т. 32. № 6. С. 41–43.
8. Johnson C.S., Keckler D.J., Braunschweiger P.G. et al. // Blood. 1989. V. 73. № 3. P. 678–683.
9. Гольдберг Е.Д., Дыгай А.М., Шахов В.П. // Методы культуры ткани в гематологии. Томск. 1992. 272 с.
10. Кетлинский С.А., Симбирцев А.С., Воробьев А.А. Эндогенные иммуномодуляторы. СПб.: Гиппократ, 1992. С. 264.
11. Орловская И.А., Дубинина Л.В., Халдоянц И.И. и др. // Онтогенез. 1994. Т. 25. № 3. С. 26–32.
12. Kostra C.J., Van der Giesen D.M., Van Krick-en J.H.J.M. et al. // Clin. and Exp. Immunol. 1997. V. 108. № 2. P. 324–332.
13. Kim B.S., Hui K.M. // J. Immunol. 1985. V. 135. N.1. P. 225–260.