

ИЗУЧЕНИЕ ИММУНОТРОПНОЙ АКТИВНОСТИ У НОВЫХ ПРОИЗВОДНЫХ АРИЛГЕТЕРОАЛКАНКАРБОНОВЫХ КИСЛОТ

О. П. Колесникова¹, О. Т. Кудяева¹, Т. Г. Сухенко¹, А. П. Лыков¹,
К. В. Гайдуль¹, В. Л. Лимонов³, А. Н. Мирскова², Г. Г. Левковская²,
М. Г. Воронков², В. А. Козлов¹

Проведен скрининг иммунотропной активности у 13 оригинальных соединений из нового класса биологически активных веществ (БАВ) — производных арилгетероалканкарбоновых кислот. Соединения проявляют выраженные миелостимулирующие/миелосупрессивные, иммуноактивные (стимулирующие/супрессорные) эффекты в тестах IgM- и IgG-антителообразования, ГЗТ на тимусзависимый антиген (ЭБ) у интактных мышей CBF1 *in vivo*. В культуре *in vitro* отмечено отсутствие влияния либо ингибирование спонтанной, ConA-, PWM-индуцированной пролиферации клеток селезенки интактных мышей.

Ключевые слова: производные арилгетероалканкарбоновых кислот, миело- и иммуноактивные свойства

ВВЕДЕНИЕ

В номенклатуре иммуномодуляторов отсутствуют синтетические средства из нового класса БАВ — трис(2-гидроксиэтил)аммониевых солей арилгетероуксусных кислот общей формулы $ArYCH_2COO^-N^+H(CH_2CH_2OH)_3$, где Y = O, S, SO, SO₂, NR. Ранее показано, что одно из производных трис-(2-гидроксиэтил)аммониевых солей арилгетероуксусных кислот — адаптогенное лекарственное средство трекрезан проявляет гемопоэз- и иммуномодулирующие свойства в различных экспериментальных системах расстройств иммунитета, в том числе сочетающихся с дисфункцией эритропоэза [1, 2].

Целью исследования являлся скрининг иммуноактивных свойств у новых соединений — производных арилгетероалканкарбоновых кислот.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В работе использовали мышей гибридов (CBA · C57BL/6)F1 (CBF1) обоего пола, 8–10-недельного возраста, массой тела 18–20 г (питомник “Рассвет”, Томск). До и в период эксперимента контрольных и опытных животных содержали в виварии в одинаковых условиях: стандартных пластиковых клетках с мелкой древесной стружкой (не более 10 особей) на стандартном рационе. Все исследования проводили в одно время суток (утром). Опыты проводили в соответствии с правилами, принятыми Европейской конвенцией по защите животных (Страсбург, 1986) и

одобренными комитетом по биомедицинской этике ГУ НИИ клинической иммунологии СО РАМН.

Миелоактивные свойства изучали, используя вещества в дозах, составляющих 1/10 ЛД₅₀, а иммунотропные — 1/10 ЛД₅₀ и 1/100 ЛД₅₀. Соединения вводили внутривентриально 1 раз в сутки, курс составил 5–7 дней. Контрольным животным вводили растворитель соединений в таком же объеме и режиме. Испытания соединений проводили в нескольких сериях опытов, каждая серия имела свой контроль. Миелоактивные свойства оценивали по [4]. Количество IgM антителообразующих клеток (IgM АОК) в селезенке мышей определяли модифицированным методом [7]. В день последнего введения соединений животных иммунизировали эритроцитами барана (ЭБ) в дозе $0,5 \cdot 10^7$ /мышь внутривенно.

Для определения числа IgG АОК *in vivo* в день последнего введения соединений проводили первичную иммунизацию 0,25% ЭБ в объеме 0,5 мл внутривентриально. Через 30 дней после первичной иммунизации проводили вторичную иммунизацию ЭБ в дозе $0,5 \cdot 10^7$ /мышь внутривенно. Количество IgG АОК определяли в селезенке на пике иммунного ответа (на 5-е сутки после вторичной иммунизации) методом локального гемолиза [9]. Для оценки выраженности реакции гиперчувствительности замедленного типа (ГЗТ) *in vivo* мышей в день последнего введения соединений сенсibilизировали внутривентриальным введением 0,25% ЭБ в объеме 0,5 мл, на 4-е сутки после сенсibilизации вводили разрешающую дозу антигена под подошвенный апоневроз задней лапы (50% ЭБ в объеме 50 мкл). В контралатеральную лапу вводили растворитель в том же объеме. Учет реакции производили через 24 ч [6]. Спонтанную и митоген-стимулированную пролиферацию клеток селезенки мышей *in vitro* оценивали по включению ³H-тимидина [8]. Митогены использовали в оптимальной дозе, что составило

¹ ГУ НИИ клинической иммунологии СО РАМН, Новосибирск, 630099, ул. Ядринцевская, 14.

² Иркутский институт органической химии им. А. Е. Фаворского СО РАН, Иркутск, 664033, ул. Фаворского, 1.

³ ООО “АБОЛмед”, Москва, 119002, ул. Карманицкий переулок, 9.

для ConA 2 мкг/мл, а для PWM — 1 мкг/мл. Соединения в трех дозах вносили в лунки одновременно с митогенами. Полученные данные обрабатывали по непараметрическому критерию U Манна-Уитни.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Как следует из данных табл. 1, все соединения группы I ряда трис-(2-гидроксиэтил)аммониевых солей производных органилтио(сульфонил) уксусных кислот (соединения под шифрами 1, 2, 3 — табл. 2) увеличивают количество лейкоцитов в периферической крови. За критерий оценки миелостимулирующих (миелодепрессивных) свойств, принимали изменение в лейкоцитарной формуле в пределах $\pm 20\%$ после введения соединения в максимально переносимой дозе в течение 7 дней [4]. Выявляется достоверное IgM АОК стимулирующее влияние соединений 2 и 3. При этом отсутствуют какие-либо эффекты этих соединений на вторичный IgG ответ и ГЗТ *in vivo*. Соединения II группы, представляющие ряд трис-(2-оксиэтил)аммониевых солей замещенных ароксиуксусных кислот (соединения под шифрами 4, 5, 6, 7, 8, 10, 13), представляют наиболее гетерогенную группу по миело- и иммуноактивным свойствам. Так, соединение 7, обладающее миелостимулирующим свойством, практически не проявляет иммуноактивных свойств и наоборот, соединение 10, не обладая миелоактивными свойствами, подавляет первичный и вторичный гуморальный иммунный ответ. Среди соединений III группы, представляющих ряд трис-(2-гидроксиэтил)аммониевых солей производных индолил-3-тиоуксусной

кислоты и ее производных (соединения под шифрами 9, 11, 12) выявляются вещества с миелодепрессивными свойствами. Соединения 11 и 12 подавляют первичный гуморальный иммунный ответ, ГЗТ, но при этом стимулируют вторичный гуморальный иммунный ответ.

Таким образом, анализируя данные табл. 1, можно заключить, что оценка иммуотропных свойств только по отдельным видам иммунологической реактивности *in vivo* затруднительна. Критериями для отбора иммуноактивных соединений, по нашему мнению, являются сопоставимые данные о миелоактивных свойствах с каким-либо типом иммунного ответа — гуморальным или клеточным.

При скрининге иммуотропной активности у соединений в культуре клеток селезенки мышей *in vitro* установлено, что в группе I только соединение 1, обладающее миелостимулирующими свойствами, но не проявляющее иммуноактивных свойств *in vivo*, подавляет ConA-стимулированную пролиферацию в дозах 1,5 – 150 мкг/мл. Среди соединений группы II только вещества 5, 7 и 8 дозозависимо подавляют PWM-стимулированную пролиферацию клеток селезенки. Соединения III группы (шифры 11, 12), подавляющие миелопоз, ГЗТ и IgM антителообразование *in vivo*, в культуре *in vitro* проявляют иммуносупрессорный эффект. Соединение 11, единственное из всех испытанных, обладает выраженной антипролиферативной активностью: во всех использованных дозах ингибирует ConA-стимулированную пролиферацию Т-клеток се-

Таблица 1. Влияние производных арилгетероалканкарбоновых кислот на количество лейкоцитов в периферической крови, количество IgM, IgG антителообразующих клеток в селезенке и выраженность ГЗТ у интактных мышей СВF1 *in vivo* (данные приведены в % относительно соответствующего контроля)

Соединение	Количество лейкоцитов	IgM	IgG	ГЗТ
<i>Группа I</i>				
1	+55*	-14	-28	+9
2	+76*	+236*	-3	-5
3	+89*	+249*	-2	-16
<i>Группа II</i>				
4	+34	-6	-29	-23*
5	+24	+49	-33	-16
6	+24	-20	-13	-2
7	+52*	+10	+47	-18
8	+21	-29	+45	-17
10	+10	-58*	-34*	+7
13	-3		-23	
<i>Группа III</i>				
9	+15	-27	+38	-13
11	-20	-47	+34	-27*
12	-16	-60	+62	-21*

* Различия достоверны по абсолютным значениям относительно соответствующего контроля.

Таблица 2. Шифры соединений

Шифр	Соединение
1	Трис-(2-гидроксиэтил)аммониевая соль 2-метилфенилтиоуксусной кислоты
2	Диметилэтаноламмониевая соль 4-хлорфенилтиоуксусной кислоты
3	Трис-(2-гидроксиэтил)аммониевая соль 4-хлорфенилсульфонилуксусной кислоты
4	Трис-(2-оксиэтил)аммониевая соль 2-хлорфеноксиуксусной кислоты
5	Трис-(2-оксиэтил)аммониевая соль 2-метил-4-хлорфеноксиуксусной кислоты
6	Трис-(2-оксиэтил)аммониевая соль 4-хлорфеноксиуксусной кислоты
7	Трис-(2-оксиэтил)аммониевая соль 2,4-дихлорфеноксиуксусной кислоты
8	Трис-(2-оксиэтил)аммониевая соль 2-бромфеноксиуксусной кислоты
9	Трис-(2-гидроксиэтил)аммониевая соль 2-метилиндолилтиоуксусной кислоты
10	Трис-(2-гидроксиэтил)аммониевая соль 2-гидроксифеноксиуксусной кислоты
11	Трис-(2-гидроксиэтил)аммониевая соль 1-бензилиндолил-3-тиоуксусной кислоты
12	Трис-(2-гидроксиэтил)аммониевая соль 1-метилиндолил-3-тиоуксусной кислоты
13	Трис-(2-оксиэтил)аммониевая соль 4-нитрофеноксиуксусной кислоты

лезенки. При этом выявляется достоверная супрессия спонтанной и PWM-индуцированной пролиферации клеток селезенки (табл. 3).

Таким образом, анализируя результаты скрининга иммуоактивных свойств *in vivo* и *in vitro*, на данном этапе к потенциальным иммуностимуляторам можно отнести соединение 3 (максимальное увеличение количества лейкоцитов в крови и IgM ответа; при этом соединение не обладает поликлональными стимулирующими свойствами *in vitro*). К потенциальным “иммунодепрессантам” можно отнести соединение 11 (максимальное подавление миелопоеза, IgM ответа и ГЗТ, иммуносупрессивные эффекты *in vitro*). При этом эффект соединения 11, вводимого в индуктивную фазу иммунного ответа, на гуморальный иммунный ответ — первичный IgM и вторичный IgG — зависел от дозы: наблюдалось как подавление, так и стимуляция того и другого ответа (данные не представлены). Поскольку соединение 11 относится к малотоксичным, представляет интерес исследование его иммуносупрессивных свойств при использовании других экспериментальных моделей, доз и схем применения.

Актуальной проблемой иммунофармакологии является создание препаратов с селективной способностью изменять баланс Th1/Th2 клеток [5]. Как видно из представленных результатов, трудно при скрининге *in vivo* на интактных животных выделить соединения с разнонаправленным влиянием на интегральные показатели — антителообразование и ГЗТ, оказывающие влияние только на гуморальный либо только на клеточный иммунный ответ. Очевидно, поиск таких соединений требует использования новых экспериментальных моделей. Для выполнения требований валидности (воспроизводимости), селективности и прогнозируемости необходима также определенная система скрининга, включающая несколько экспериментальных моделей [3].

Таблица 3. Влияние соединений 3 и 11 на спонтанную, PWM- и ConA-индуцированную пролиферацию клеток селезенки интактных мышей CBF1 *in vitro*

Соединение	Доза, мкг/мл	Пролиферация		
		спонтанная	PWM-индуцированная	ConA-индуцированная
Контроль		3386	6960	18356
3	3	4338	7104	18628
	30	3658	7034	18134
	300	1792	5222	15128
Контроль		3236	7306	16010
11	3	2702	6440	13266
	30	2396	5658	12968
	300	570	141	125

Примечание. Выделенные показатели достоверны по отношению к соответствующему контролю, $p < 0,05$.

ВЫВОД

Производные арилгетероалканкарбоновых кислот проявляют выраженные иммуотропные свойства *in vivo* и *in vitro*.

ЛИТЕРАТУРА

1. О. П. Колесникова, О. Т. Кудаева, Т. Г. Сухенко и др., Докл. АН, 391(3), 1 – 3 (2003).
2. Регистр лекарственных средств России, Информхим, Москва (1995).
3. Б. С. Утешев, Фармакол. и токсикол., 47(3), 5 – 13 (1984).
4. Б. С. Утешев, Е. В. Арзамасцев, Экспер. и клин. фармакол., 59(3), 3 – 8 (1996).
5. Р. М. Хаитов, Б. В. Пинегин, Иммунология, 4, 196 – 203 (2003).
6. A. J. Crowle, Adv. Immunol., 20, 197 – 264 (1975).
7. A. J. Cunningham and A. Szenberg, Immunology, 14(4), 599 – 600 (1968).
8. D. M. Marcus, A. Dustira, I. Diego, et al., Cell Immunol., 104(1), 71 – 78 (1987).
9. J. Sterzl and I. Riha, Nature, 208(5013), 858 – 859 (1965).

Поступила 29.08.05

SCREENING OF NEW DERIVATIVES OF ARYLHETEROALKANECARBOXYLIC ACID ON THE IMMUNE SYSTEM

O. P. Kolesnikova¹, O. T. Kudaeva¹, T. G. Sukhenko¹, A. P. Lykov¹, K. V. Gaidull¹, V. L. Limonov³, A. N. Mirskova², G. G. Levkovskaya², M. G. Voronkov², and V. A. Kozlov¹

¹ Institute of Clinical Immunology, Siberian Division, Russian Academy of Sciences, ul. Yadrintsevskaya 14, Novosibirsk, 63099 Russia;

² Favorsky Institute of Organic Chemistry Siberian Division, Russian Academy of Sciences, ul. Favorskogo 1, Irkutsk, 664033 Russia;

³ ABOLmed, ul. Karmanutskii per., 9, Moscow, 119002, Russia

The screening of 13 original compounds from the group of derivatives of arylheteroalkanecarboxylic acid on immunity were performed. The compounds exhibit strong myelostimulating/myelosuppressive property, increased or decreased influence on the: PFC (IgM and IgG), DTH at the sheep erythrocytes in CBF1 *in vivo*. In contrast, *in vitro* the compounds had no effect or inhibited the spontaneous, ConA or PWM induced proliferation of the splenocytes from normal mice. The problems of the universal methods of the screening of immunoactive properties of compounds are discussed.