

РОССИЙСКАЯ АКАДЕМИЯ НАУК
Иркутский институт химии им. А. Е. Фаворского СО РАН

РОССИЙСКАЯ АКАДЕМИЯ МЕДИЦИНСКИХ НАУК
НИИ клинической иммунологии СО РАМН

Новокузнецкий научно-исследовательский
химико-фармацевтический институт

ВИЛИМ

ДОКЛИНИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

Новосибирск
2008

*О.П. Колесникова, О.Т. Кудяева, Т.Г. Сухенко, А.П. Лыков,
К.В. Гайдунь, *А.Н. Мирскова, *Г.Г. Левковская,
М.Г. Воронков, В.А. Козлов
НИИ клинической иммунологии СО РАМН,
*Иркутский институт химии
им. А.Е. Фаворского СО РАН

СКРИНИНГ ИММУНОАКТИВНЫХ СВОЙСТВ НОВЫХ ПРОИЗВОДНЫХ АРИЛГЕТЕРОАЛКАНКАРБОНОВЫХ КИСЛОТ

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 $Y=O, S, SO, SO_2, NR$. Ранее показано, что одно из производных трис-(2-гидроксиэтил)аммониевых солей арилгетероуксусных кислот – адаптогенное лекарственное средство трекрезан проявляет гемопоэз- и иммунопоэз модулирующие свойства в различных экспериментальных системах расстройств иммунитета, в том числе сочетающихся с дисфункцией эритропоэза [1, 2].

Целью исследования являлся скрининг иммуноактивных свойств новых соединений – производных арилгетероалканкарбонных кислот.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В работе использовали мышей гибридов (СВАхС57ВL/6)F1 (СВF1) обоего пола, 8-10-недельного возраста, массой тела 18-20 г. (питомник «Рассвет», г. Томск). До и в период эксперимента контрольные и опытные животные содержались в виварии в одинаковых условиях: стандартных пластиковых клетках с мелкой древесной стружкой (не более 10 особей) на стандартном рационе. Все исследования проводились в одно и то же время суток (утром). Опыты проводили в соответствии с правилами, принятыми Европейской конвенцией по защите животных (Страсбург, 1986), и одобренных комитетом по биомедицинской этике ГУ НИИ клинической иммунологии СО РАМН.

Миелоактивные свойства испытывали в дозах, составляющих $1/5 LD_{50}$, а иммуностропных свойств – $1/5 LD_{50}$ и $1/50 LD_{50}$. Соединения вводили внутривентриально 1 раз в сутки, курс составил 5-7 дней. Контрольным животным в таком же объеме и режиме вводили растворитель соединений.

Испытания соединений проводили в несколько серий опытов, соответственно каждая серия опытов 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 внутривенно эритроцитами барана (ЭБ) в дозе 10^7 /мышь.

Для определения числа IgG АОК *in vivo* в день последнего введения соединений проводили первичную иммунизацию 0,25% ЭБ в объеме 0,5 мл внутрибрюшинно. Через 30 дней после первичной иммунизации проводили вторичную иммунизацию ЭБ в дозе 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 внутрибрюшинным введением 0,25% ЭБ в объеме 0,5 мл, на 4-е сутки после сенсibilизации вводили разрешающую дозу антигена под подошвенный апоневроз правой задней лапы (50% ЭБ в объеме 50 мкл). В контралатеральную лапу вводили растворитель в том же объеме. Учет реакции производили через 24 часа [6]. Спонтанную и митоген-стимулированную пролиферацию клеток селезенки мышей *in vitro* оценивали по включению ^3H -тимидина [8]. Митогены использовали в оптимальной дозе, что составило для Con A 2 мкг/мл, а для PWM – 1 мкг/мл. Соединения в трех дозах вносили в лунки одновременно с митогенами. Полученные данные обрабатывались по непараметрическому критерию U Манна-Уитни (Гублер Е. В., 1978).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Как видно из данных таблицы 1, все соединения группы I ряда трис-(2-оксиэтил)аммониевых солей производных органилтио(сульфонил) уксусных кислот (соединения под шифром 1, 2, 3) достоверно увеличивают количество лейкоцитов в периферической крови. За критерий оценки миелостимуляторных (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 ароксисукусных кислот (соединения под шифром 4, 5, 6, 7, 8, 10, 13), представляют наиболее гетерогенную группу по миело- и иммуноактивным свойствам. Так, соединение 7,

обладающее достоверными миелостимулирующими свойствами, практически не выявляет иммуноактивных свойств и наоборот, соединение 10, не обладая миелоактивными свойствами, достоверно 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 шифром 9, 11, 12), выявляются соединения с миелодепрессивными свойствами. Соединения 11 и 12 подавляют первичный гуморальный иммунный ответ, ГЗТ, но при этом стимулируют вторичный гуморальный иммунный ответ.

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)

Шифр соединения	Кол-во лейкоцитов	IgM	IgG	ГЗТ
Группа I				
№ 1	+55*	-14	-28	+9
№ 2	+76*	+236*	-3	-5
№ 3	+89*	+249*	-2	-16
Группа II				
№ 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	
Группа III				
№ 9	+15	-27	+38	-13
№ 11	-20	-47	+34	-27*
№ 12	-16	-60	+62	-21*

*достоверно по абсолютным значениям относительно соответствующего контроля.

Таким образом, анализируя данные таблицы 1, видно, что оценка иммуностропных свойств только по отдельным видам иммунологической реактивности *in vivo* достаточно затруднительна. Критериями для отбора

иммуноактивных соединений, по нашему мнению, являются сопоставимые данные о миелоактивных свойствах с каким-либо типом иммунного ответа – гуморальным или клеточным. Проведен скрининг иммуотропной активности всех соединений в культуре клеток селезенки мышей *in vitro*. Установлено, что среди соединений группы I только соединение 1, обладающее достоверными миелостимулирующими свойствами, но не обладающее иммуноактивными свойствами *in vivo*, достоверно подавляет ConA-стимулированную пролиферацию в дозе от 1,5 до 150 мкг/мл. Среди соединений группы II только соединения 5, 7 и 8 достоверно дозозависимо подавляют PWM-стимулированную пролиферацию клеток селезенки. Соединения III группы (соединения под шифром 11, 12), подавляющие миелопоэз, ГЗТ и IgM антителообразование *in vivo*, в культуре *in vitro* проявляют иммуносупрессорный эффект. Соединение 11, единственное из всех испытанных соединений, обладает выраженной антипролиферативной активностью: все испытанные дозы ингибируют ConA-стимулированную пролиферацию Т-клеток селезенки, выявляется достоверная супрессия спонтанной и PWM-индуцированной пролиферации клеток селезенки (табл. 2).

Таблица 2

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

Шифр соединения	Доза (мкг/мл)	Спонтанная	PWM	ConA
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

15128 – выделено жирным шрифтом – достоверно относительно соответствующего контроля, $P < 0,05$.

Таким образом, анализируя результаты скрининга иммуноактивных свойств *in vivo* и *in vitro*, на данном этапе к потенциальным «иммуностимуляторам» может быть отнесено соединение 3 (максимальное увеличение количества лейкоцитов в крови и IgM ответа; но 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 вида ответа (данные не представлены). Поскольку соединение 11 относится к малотоксичным соединениям, представляет интерес исследование его иммуносупрессивных свойств при использовании других экспериментальных моделей, доз и схем его применения.

Актуальной проблемой иммунофармакологии является создание препаратов с селективной способностью изменять баланс Th1/Th2 клеток [5]. Как видно из представленных результатов, достаточно трудно при скрининге *in vivo* на интактных животных выделить соединения с разнонаправленным влиянием на интегральные показатели – антителообразование и ГЗТ, оказывающих влияние либо только на гуморальный, либо только на клеточный иммунный ответ. Очевидно, что 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].

ВЫВОДЫ

1. Производные арилгетероалканкарбоновых кислот проявляют выраженные иммуотропные свойства *in vivo* и *in vitro*.
2. Сопоставление данных *in vivo* о миелоактивных свойствах, эффектами на гуморальный и клеточный иммунный ответ с данными *in vitro*, выполненные на интактных животных, позволяют выявлять на этапе скрининга «потенциальные» иммуноактивные соединения.
3. Поиск селективных иммуотропных соединений требует использования новых экспериментальных подходов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Колесникова О.П., Кудаева О.Т., Сухенко Т.Г. и др. 2003. Докл. акад. наук, 391(3), 1–3.
2. Регистр лекарственных средств России, Информхим, Москва, 1995.
3. Утешев Б.С. 1984. Фармакол. и токсикол., 47(3), 5–13.
4. Утешев Б.С., Арзамасцев Е.В. 1996. Экспер. и клинич. фармакол., 59(3), 3–8.
5. Хаитов Р.М., Пинегин Б.В. 2003. Иммунология, 4, 196–203.

6. Crowle A.J. 1975. *Adv. Immunol.*, 20, 197–264.
7. Cunningham A.J., Szenberg A. 1968. *Immunology*, 14 (4), 599–600.
8. Marcus D.M., Dustira A., Diego I. et al., 1987. *Cell Immunol*, 104 (1), 71–78.
9. Sterzl J., Riha I. 1965. *Nature*. 208(5013), 858–859.