

На правах рукописи

Тузова Марина Николаевна

**ИММУНОМОДУЛИРУЮЩИЕ СВОЙСТВА НОВЫХ ПРОИЗВОДНЫХ
ИНДОЛИЛ-3-АЦЕТАТА И ГЕРМАНИЙОРГАНИЧЕСКИХ СОЕДИНЕНИЙ**

14.00.36 - Аллергология и иммунология

**Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук**

Новосибирск - 1995

Работа выполнена в Институте клинической иммунологии
Сибирского отделения РАМН

Научный руководитель - член-корреспондент РАМН, профессор
В. А. Козлов

Официальные оппоненты: доктор медицинских наук К. В. Гайдуль;
доктор медицинских наук А. А. Демин

Ведущая организация - НИИ фармакологии ТНЦ СО РАМН

Защита диссертации состоится "____" _____ 1995 года
в _____ часов на заседании Специализированного совета
Д 001.01.01 Института клинической иммунологии СО РАМН
(630091, Новосибирск, ул. Ядринцевская, 14)

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Института
клинической иммунологии СО РАМН

Автореферат разослан "____" _____ 1995 года

Ученый секретарь

Специализированного совета

кандидат биологических наук



О. Т. Кудяева

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

АКТУАЛЬНОСТЬ ПРОБЛЕМЫ. Проблемы иммунофармакологии находятся в центре внимания современной клинической иммунологии. От их позитивного решения зависит решение ряда актуальных задач, стоящих перед клиницистами при лечении системных заболеваний иммунитета (аутоиммунной патологии, трансплантации органов и тканей, аллергических болезней, иммунодефицитов различной этиологии и др.).

Проблемы поиска адекватных средств иммунопатогенетической терапии имеют в общем виде два аспекта: во-первых, чрезвычайно сложная структура иммунной системы, имеющая прямые и обратные связи как внутри ее самой, так и во взаимоотношениях с медиаторами центральной нервной и эндокринной системы, обуславливает значительную сложность целенаправленной коррекции. Во-вторых, существуют методологические проблемы поиска иммуноактивных препаратов, связанные с отсутствием апробированных адекватных модельных систем отбора биологически-активных веществ на доклиническом этапе скрининга.

Наряду со стандартными препаратами, исторически разделенными на группы иммуностимуляторов (Т-активин, левамизол, продигозан и др.) и используемыми в основном для лечения инфекционных синдромов и вторичных иммунодефицитных состояний или аллергической патологии, и иммуносупрессоров (глюкокортикоиды, циклофосфамид, б-меркаптопурин, азатиоприн), используемых в основном в лечении аутоиммунных и злокачественных заболеваний, последнее время появляется все большее количество новых препаратов с нестандартной химической структурой и выраженным иммуотропным действием.

В связи с достижениями химического синтеза, в центре внимания оказались металлоорганические соединения как потенциальные лекарственные препараты. Многие металлы, особенно в качестве микроэлементов, способствуют нормальному созреванию и функционированию иммунокомпетентных клеток (Beisel W.R., 1982). Причем, биологическая активность микроэлементов в составе органических соединений возрастает по сравнению с неорганическими солями (Лазарева и др. 1985). В частности, наше внимание привлекли германийорганические соединения, которые проявляют нейротропное действие, потенцируют наркотический эффект гексенала и являются антигипоксантами, способствуют регенерации компонентов соединительной ткани и проявляют выраженные противовирусные свойства (Биологическая активность соединений кремния, германия и олова. IV всесоюзная конференция. Тез. докл. Иркутск, 1990).

Множество литературных источников свидетельствуют об их опосредованном влиянии через макрофаги и Т-лимфоциты (Suzuki F., 1986; Azuma I., 1989). Есть данные о стимулирующем влиянии соединений германия на антителогенез в селезенке мышей (Suzuki F., 1986). Однако, полного представления о механизме действия германийорганических соединений на разные звенья иммунного ответа до сих пор не сложилось.

Анализ патентной информации свидетельствует о перспективности поиска новых иммуноактивных соединений среди производных алканкарбоновых кислот, которые проявляют противовоспалительные свойства и обладают широким спектром биологической активности. Эта группа веществ относится к производным индолил-3-ацетата. Сам индолил-3-ацетат является растительным гормоном. Изучены его стимулирующие свойства на рост и вегетацию растений, усиление их цветения и плодоношения (Ap Rees Tom, 1991; Atal S.K., et al. 1986). Считается, что эффект его производных на иммунокомпетентные клетки опосредован нормализацией функции Т-супрессоров, изменением внутриклеточного метаболизма, в частности, ингибированием синтеза лейкотриенов посредством блокады липоксигеназного цикла окисления арахидоновой кислоты. Но в целом механизм действия как самого индолил-3-ацетата, так и вновь синтезированных его производных на клетки иммунной системы не является изученным и требует дальнейшего исследования.

Однако, применение новых иммуномодулирующих средств сдерживается с одной стороны, нечеткими представлениями о патогенезе корригируемого состояния, а с другой стороны - о механизмах действия данного препарата, используемого в качестве лечебного средства.

Представлялось актуальным провести скрининг иммуотропных свойств соединений на интактных животных и индуцированной аутоиммунной патологии для оценки адекватности применяемых методов и моделей. Такой подход необходим для проверки достоверности воздействия препарата, так как часто наличие эффекта на интактных животных совсем не означает, что тестируемое вещество будет проявлять подобные свойства и на модели заболевания, и далее - на клиническом этапе исследования.

Однако, оставалось неясным, к какой группе иммуотропных веществ отнести данные тестируемые препараты: иммуносупрессоры или иммуностимуляторы, ввиду проявления различных свойств в норме и патологии. Неясными оставались и клетки-мишени для данных иммуно-

модуляторов, возможность их влияния непосредственно на мембранные рецепторы или опосредованно, стимулируя выделение лимфо- или монокинов.

ЦЕЛЬ И ЗАДАЧИ ИССЛЕДОВАНИЯ. Цель настоящего исследования состояла в изучении иммуотропной активности соединений двух новых химических групп - производных алканкарбоновых кислот (АКК) и германийорганических соединений (ГОС) - в экспериментальных модельных системах.

В соответствии с целью решались следующие задачи:

1. Изучить иммуноактивные свойства производных АКК и ГОС в экспериментальной системе *in vivo*.
2. Изучить иммунофармакодинамику производных АКК и ГОС в экспериментальной системе *in vitro*.
3. Провести сравнительный анализ иммуотропной активности производных АКК и ГОС с известными аналогами.
4. Изучить клиническую и иммунологическую эффективность применения производных АКК и ГОС в лечении экспериментального аутоиммунного заболевания.

НАУЧНАЯ НОВИЗНА РЕЗУЛЬТАТОВ ИССЛЕДОВАНИЙ. Впервые установлено, что производные индолил-3-ацетата и вещества германийорганической природы проявляют иммуномодулирующие свойства в модельных системах *in vivo* и *in vitro*.

Выраженный лечебный эффект соединения ВМ-2-84 при РТЦХ-индуцированном *Lupus*-подобном нефрите, а также селективное депрессивное Т-лимфотропное действие можно связать с нормализующим влиянием на клон ТН2, играющий ведущую роль в развитии данной патологии.

По-видимому, стимуляция подавленного уровня IgG *in vitro* у мышей с экспериментальным ГН под действием изучаемых соединений также опосредуется через влияние ТН2.

Механизм действия соединений достоверно отличается от известных иммуномодулирующих средств: индометацина как ингибитора циклооксигеназы, который в стандартных условиях опыта стимулирует пролиферативный ответ, а препараты его подавляют, и циклоспорина А, как ингибитора только ранних стадий Т-клеточной активации, тогда как эффект препаратов сохраняется через 4, 24 и 48 часов от начала воздействия.

В условиях *in vivo* соединения стимулировали количество АСК и подавляли ГЗТ у интактных животных, а при проведении курса инъекций животным с экспериментальным *Lupus*-подобным нефритом, оказыва-

ли стойкий лечебный эффект, что подтверждалось как снижением уровня протеинурии, так и улучшением морфологической картины почечной ткани, заключающемся в торможении явлений хронического воспаления с иммунологическим компонентом.

ТЕОРЕТИЧЕСКАЯ И ПРАКТИЧЕСКАЯ ЗНАЧИМОСТЬ РАБОТЫ. Система скрининга новых иммуноактивных соединений, отработанная нами, включает использование клеток интактных и больных животных, а также экспериментальную модель РТПХ-индуцированного Lupus-подобного нефрита для оценки лечебного эффекта. Влияние препаратов на клетки больных мышей позволяют считать недостаточным использование только интактных животных, широко применяемое ранее. Нами предложена система отбора эффективных Т-лимфотропных соединений для коррекции нарушений, связанных с дисфункцией Т-системы иммунитета.

Полученные результаты дают основание для создания новых лекарственных средств в лечение аутоиммунной патологии. На соединение ВМ-2-84 - серопроизводное индолил-3-ацетата - получена приоритетная справка на новый иммуномодулятор (коммерческое название индацетамин) заявка N 93-16671 (016342) от 31.03.92.

Соединения ВМ-38-80 и ВМ-38-81, относящиеся к азотопроизводным индолил-3-уксусной кислоты, наряду с веществами германийорганической природы, находятся на стадии доклинических испытаний.

ОСНОВНЫЕ ПОЛОЖЕНИЯ, ВЫНОСИМЫЕ НА ЗАЩИТУ.

1. Производные АКК и ГОС обладают выраженными иммуноактивными свойствами, заключающимися в регуляции функциональной активности гуморального и клеточно-опосредованного иммунного ответа у интактных и больных животных.

2. Лечебное действие соединения ВМ-2-84 in vivo на животных с экспериментальным РТПХ-индуцированным Lupus-подобным нефритом заключается в достоверном снижении протеинурии и подтверждается морфологическими исследованиями, и, возможно, связано с его воздействием на центральное звено иммуногенеза СКВ.

3. Система поиска иммуноактивных средств включает использование интактных и больных иммунокомплексным ГН животных, и адекватна для отбора соединений, регулирующих нарушения межклеточных взаимодействий при аутоиммунной патологии.

АПРОБАЦИЯ РАБОТЫ И ПУБЛИКАЦИИ. Материалы диссертации доложены на Всесоюзном симпозиуме с международным участием "Патогенез хронического воспаления" (Новосибирск, 1991), 1-ом съезде иммунологов

России (Новосибирск, 1992), научном отчете Института клинической иммунологии СО РАМН за 1993 г. (Новосибирск, 1994), на 1-ом международном симпозиуме РАЛАН (Москва, 1992). Апробация диссертации состоялась на расширенном научном семинаре Института клинической иммунологии СО РАМН 11 мая 1995 года. По теме диссертации опубликовано 9 работ.

ОБЪЕМ И СТРУКТУРА ДИССЕРТАЦИИ. Материалы диссертации изложены на 158 страницах машинописного текста, работа иллюстрирована 36 рисунками. Диссертация состоит из введения, обзора литературы в 4 главах, результатов исследований в 7 главах, их обсуждения и выводов. Список литературы включает 306 источников, из них 40 на русском языке.

СОДЕРЖАНИЕ ДИССЕРТАЦИИ МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Животные - В работе использовались мыши-гибриды (C57B1/6 x DBA/2)F1, полученные из питомника РАМН "Столбовая" в количестве 2500 особей.

Модели - Тестирование проводилось в различных модельных системах *in vivo* и *in vitro* как с использованием клеток интактных животных, так и клеток мышей с аутоиммунным гломерулонефритом, индуцированным хронической реакцией "трансплантат против ховяина" (РТПХ-индуцированным ГН). Индукция хронической РТПХ осуществлялась *in vivo* путем введения самкам гибридов (C57B1/6 x DBA/2)F1 лимфоидных клеток родительской линии DBA/2. Клетки лимфатических узлов, тимуса и селезенки вводились двукратно с интервалом 7 дней в соотношении 1:3:6 соответственно. Наличие гломерулонефрита тестировали через месяц по уровню протеинурии. Диагностически значимым считался уровень не менее 3 г/л, что соответствовало морфологическим критериям гломерулонефрита. В опытах использовались мыши с гломерулонефритом на различных сроках заболевания (3, 5 и 9 мес), началом заболевания был условно принят момент индукции РТПХ. Для контроля использовались интактные животные того же генотипа, пола и возраста, что и в опыте.

Морфологический анализ органов иммунной системы мышей-гибридов (C57B1/6 x DBA/2)F1 как интактных, так и с РТПХ-индуцированным аутоиммунным гломерулонефритом проводился методом обзорной микроскопии, общегистологическими методами и непрямым иммунопероксидажным методом сотрудником института клинической и экспериментальной лимфологии СО РАМН, к.м.н. Логиновым В.А., и патоморфологом НИИИХ

СО РАМН, к.м.н. Ларионовым П.М.

Среды - в работе использовалась культуральная среда следующего состава (как для выделения, так и для культивирования клеток) - RPMI-1640 (НПО "Вектор"), забуференная HEPES 10 мМ ("Sigma"), L-глутамином (НПО "Вектор") и 2-меркаптоэтанолом ("Sigma") в концентрации 4×10^{-5} М.

Количество АОК в селезенке мышей оценивали на 4-е сутки после внутривенной иммунизации эритроцитами барана (ЭБ) 2×10^8 по количеству локальных зон гемолиза в полужидкой среде модифицированным методом (Cunningham, 1968).

В части опытов перед иммунизацией мышей подвергали сублетальному или летальному облучению в дозах 300 и 850 Rn соответственно. Исследуемые препараты вводились опытным группам мышей 3-кратно, через день, внутрибрюшинно, в дозе 50 мг/кг. Контрольной группе животных в том же объеме (0,5 мл) вводился растворитель (вода для инъекций).

Влияние препарата на выраженность реакции ГЗТ оценивалось по стандартной методике локальной ГЗТ (Crowle, 1975). Учет реакции проводили через 24 часа по величине местного отека. Результаты выражали в процентах и сравнивали с таковыми у контрольной группы животных, не получавших инъекции препаратов.

При изучении воздействия препаратов на кооперацию Т- и В-лимфоцитов *in vivo* использовалась модель адоптивного переноса сингенных клеток. (Методические материалы по экспериментальному и клиническому испытанию действия фармакологических средств. МЗ СССР, Москва, 1984). Результаты оценивались на 8-е сутки методом локального гемолиза по количеству антителообразующих клеток (Cunningham, 1968).

Клеточная суспензия готовилась из клеток тимуса и/или селезенки мышей *ex tempore* при $+4^{\circ}\text{C}$ в полной культуральной среде. Для определения жизнеспособности клеток в суспензии использовали 0,2% раствор трипанового синего, приготовленного на 0,9% растворе хлорида натрия.

Удаление прилипающих клеток из популяции спленоцитов проводили по Mosier, 1969. Разделение лимфоцитов на Т и В-клетки проводили по стандартной методике на нейлоновой вате. Чистоту разделения контролировали в тестах с митогенами (конканавалином А и липополисахаридом *E.coli* 055:B5, по Gougeon et al., 1985). Выделение В-клеток проводили с помощью моноклональных анти Thy-1,2 антител методом комплемент-опосредованного цитолиза.

Тестируемые соединения - субстанции производных алканкарбоновых кислот (АКК) и германийорганических соединений (ГОС) были синтезированы в Иркутском институте органической химии СО РАН и любезно предоставлены доктором химических наук, профессором Мирсковой А.Н. и кандидатом химических наук Барышковым В.П. Химическая структура соединений является предметом авторских свидетельств с запретом открытой публикации, поэтому, в дальнейшем они имеют обозначения ВМ-2-84, ВМ-38-80, ВМ-38-81 и ГР-1, 2, 3. Растворы веществ готовили *ex tempore* в среде RPMI-1640 без культуральных добавок в конечных концентрациях 5, 50 и 250 мкг/мл, в качестве контроля использовалась среда RPMI-1640 без растворенных в ней веществ. В части экспериментов растворы исследуемых веществ вводились мышам *in vivo* в дозе 50 мг/кг, внутривенно, трехкратно, через день. Через сутки после последней инъекции тимоциты и спленоциты этих мышей выделяли и использовали в культурах клеток. В экспериментах *in vivo* вещества растворялись в апиrogenной воде для инъекций.

Препараты сравнения - с этой целью использовались циклоспорин А (Cs А, Sandimmune, Sandoz Pharmaceutical) и индометацин ("Sigma"). Конечная концентрация CsА составляла 200 нг/мл, а индометацина - 5, 50 и 250 мкг/мл.

Культивирование клеток осуществлялось в круглодонных планшетах для иммунологических реакций ("Linbro") при +37°C в атмосфере 5% CO₂ и 95% воздуха. Абсолютное количество клеток, вносимых в лунку, составляло 2×10^6 . Лимфоциты стимулировали митогенами - конканавалином А (ConА, "Farmacia") или липополисахаридом (LPS *E.coli* 055:B5, "Sigma"). Концентрации митогенов подбирались предварительным титрованием и составили для ConА 5, 10 и 25 мкг/мл, а для LPS - 25, 50 и 100 (в части опытов - 200) мкг/мл.

Растворы препаратов вносили в лунки как одновременно с митогеном, так, в части опытов, и через 4, 24 и 48 часов от начала культивирования клеток в дозах 5, 50 и 250 мкг/мл.

Пролиферативную активность клеток оценивали по включению ³H-тимидина в ДНК делящихся клеток. Результаты выражали в имп/мин включенного тимидина на 2×10^5 клеток, оценка данных проводилась как с помощью абсолютных цифр, так и с помощью индекса стимуляции (ИС) по формуле: ИС = имп/мин опыт / лунку : имп/мин контроль / лунку.

В смешанной культуре лимфоцитов (СКЛ) клетками-стимуляторами были спленоциты мышей-гибридов (C57Bl/6 x DBA/2)F1, а респондерами

- клетки селезенки мышей DBA (Adriana C. Bonomo, 1990).

Влияние испытуемых соединений на синтез IgG in vitro оценивали в супернатанте культуры мышиных спленоцитов, стимулированных LPS E.coli 055:B5 иммуноферментным методом. Оценка результатов проводилась как в абсолютных значениях IgG (мкг/мл), так и с помощью индекса стимуляции (ИС) по формуле:

ИС-LPS-стимулированный синтез IgG : спонтанный синтез IgG.

Изучение влияния препаратов проводилось и в культурах спленоцитов, стимулированных препаратами rIL-1 и rIL-2. Активирующие дозы препаратов rIL-1 и rIL-2 составили 100 нг/мл для rIL-1 и 10, 100 и 1000 ед /мл для rIL-2 с целью стимуляции различных клеточных субпопуляций. Оценка пролиферативной активности спленоцитов проводилась по включению ³H-тимидина описанным выше способом.

Полученные данные обрабатывались по непараметрическому критерию U Вилкоксона-Манна-Уитни (Гублер Е.В, 1978г.).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

СКРИНИНГ ИММУНОАКТИВНЫХ СВОЙСТВ ПРОИЗВОДНЫХ АЛКАНКАРБОНОВЫХ КИСЛОТ И ГЕРМАНИЙОРГАНИЧЕСКИХ СОЕДИНЕНИЙ IN VIVO

Установлено, что после введения соединений ВМ-2-84, ВМ-38-80, ВМ-38-81 и ГР-1,3 интактным мышам in vivo, наиболее значительные изменения наблюдаются в тимусе и лимфоузлах: соединения ВМ-2-84, ГР-1 и ГР-3 вызывают снижение массы тимуса, а соединения ВМ--38-80 и ВМ-38-81 вызывают увеличение массы тимуса и массы пахового лимфоузла (табл.1). Таблица 1.

вещество	масса тимуса	масса лимфоузла
контроль	28.4 ± 3.05 мг	2.8 ± 0.14 мг
ГР-1	23.9 ± 2.45*	2.8 ± 0.52
ГР-3	27.8 ± 3.83	3.4 ± 0.33*
ВМ-2-84	22.8 ± 1.78*	2.9 ± 0.11
ВМ-38-80	37.0 ± 8.2*	4.0 ± 0.35**
ВМ-38-81	39.2 ± 6.26*	4.0 ± 0.59*

* - P > 0.95

** - P > 0.99 здесь и далее.

При анализе влияния препаратов на первичный гуморальный иммунный ответ in vivo использовались как интактные мыши, так и мыши с пострadiационной иммуносупрессией, результаты оценивались по количеству АОЖ в селезенке. Установлено, что все соединения обладают иммуностимулирующими свойствами в дозе 5, 50 мг/кг веса (рис.1,2).

Исследования кооперативного взаимодействия Т- и В-лимфоцитов *in vivo* показали, что у мышей, получавших инъекции ВМ-2-84 и ГР-3, оно снижено по сравнению с интактными мышами: в комбинации $T_{ГР-3} + B_{инт}$ супрессивный эффект достоверный, тогда как в комбинации $T_{инт} + B_{ГР-3}$ наблюдается достоверная стимуляция антителособразования (рис.3). Анализ влияния препаратов на реакцию ГЗТ *in vivo* выявил достоверное ее подавление у интактных мышей, получавших инъекции Гр-2, ГР-3, ВМ-38-80 и ВМ-2-84 (рис.4).

Снижение массы тимуса, подавление кооперативного взаимодействия, супрессия ГЗТ под действием соединений можно расценивать как Т-лимфотропный депрессивный эффект. Необходимо отметить, что наиболее стабильно Т-лимфотропное действие проявляет соединение ВМ-2-84 из группы производных индолил-3-ацетата, а из германийорганических соединений - ГР-3.

Известно, что клонами TH1 опосредована локальная реакция ГЗТ, определяемая по отеку подошвенной поверхности лапы после введения антигена (P.Gergely, 1992). Подавление реакции ГЗТ *in vivo*, наблюдаемое при воздействии препаратов ГР-1, ГР-2, ГР-3, ВМ-2-84, и в меньшей степени ВМ-38-80 и ВМ-38-81, может свидетельствовать о подавлении клонов TH1 как одном из вариантов действия исследованных препаратов.

Результаты по скринингу *in vivo* в целом свидетельствуют о способности соединений проявлять Т-лимфотропное депрессивное действие наряду со стимуляцией первичного гуморального иммунного ответа.

ИЗУЧЕНИЕ ЛЕЧЕБНОГО ЭФФЕКТА ПРОИЗВОДНОГО ИНДОЛЛ-3-АЦЕТАТА ВМ-2-84 НА МОДЕЛИ LUPUS-НЕФРИТА

Проведен курс лечения соединением ВМ-2-84 группы мышей с аутоиммунным гломерулонефритом: соединение вводили через день в течение 1 месяца внутривнутрибрюшинно в дозе 50 мг/кг. Течение нефрита оценивали по величине протеинурии еженедельно.

Установлено, что введение препарата больным мезангиальным гломерулонефритом мышам тормозит развитие хронического воспаления с иммунологическим компонентом в ткани почки, что находит подтверждение в подавлении пролиферации гистиоцитов, снижении фиксации компонентов иммунных комплексов, торможении формирования лимфоидных инфильтратов мозгового и коркового вещества.

После курса лечения препаратом ВМ-2-84 из 24 пролеченных мышей у 17 наблюдали снижение протеинурии, что составляет 70,8%. У

Рисунок 1.

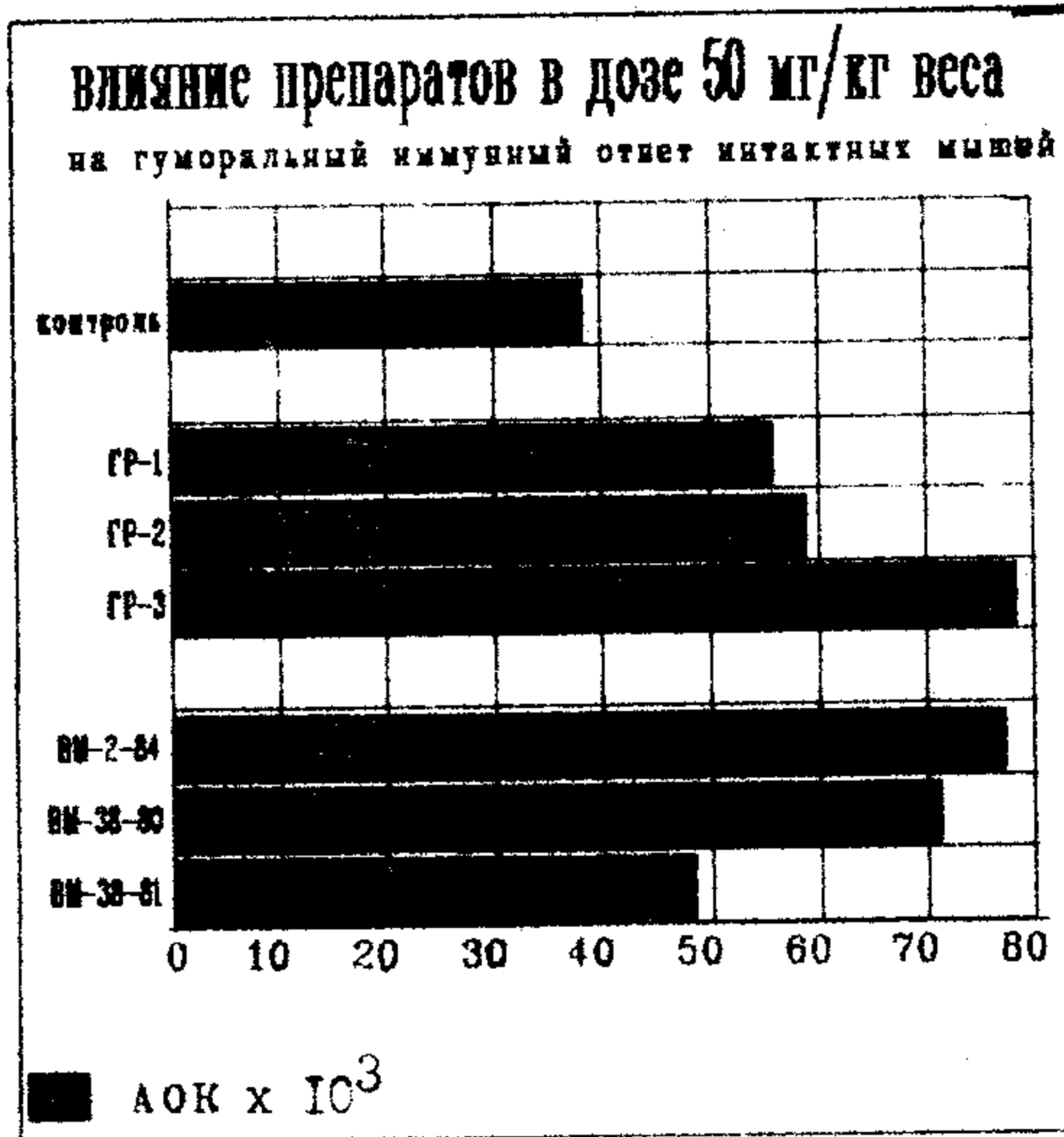


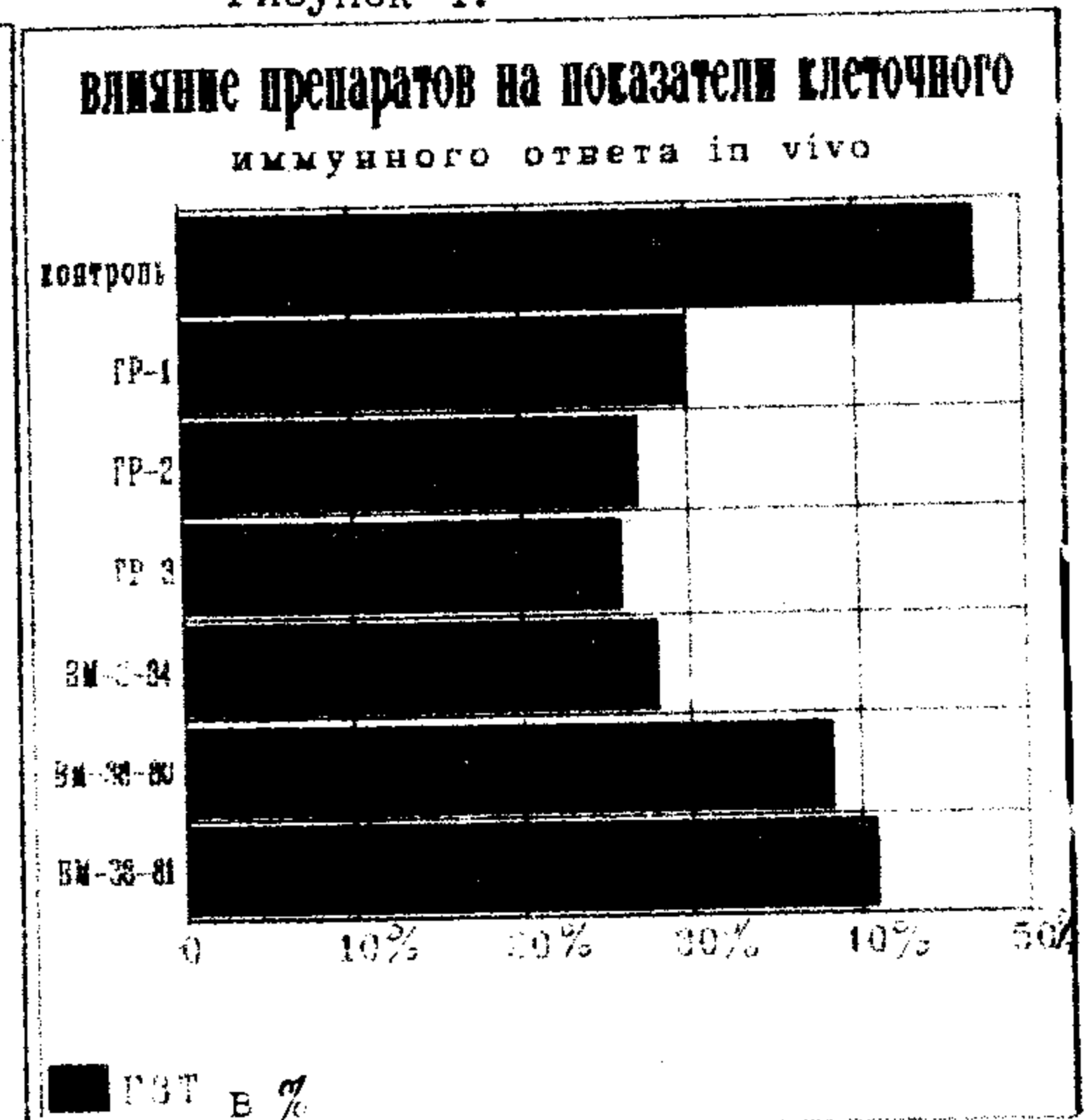
Рисунок 3.



Рисунок 2.



Рисунок 4.



3-х мышей уровень протеинурии не изменился (12,5%), у 4-х мышей наблюдали повышение уровня протеинурии (16,6%) (рис.5).

Таким образом, соединение ВМ-2-84 оказывает благоприятное (тормозящее) влияние на течение волчаночного нефрита у мышей.

ИЗУЧЕНИЕ ВЛИЯНИЯ ПРЕПАРАТОВ НА ФУНКЦИОНАЛЬНУЮ АКТИВНОСТЬ КЛЕТОК ИНТАКТНЫХ ЖИВОТНЫХ IN VITRO

Исследования пролиферативной активности тимоцитов и спленоцитов интактных мышей-гибридов (С57В1/6 х DBA/2)F1 показали, что герматраны подавляют ConA-индуцированную пролиферацию in vitro как клеток тимуса, так и селезенки, причем, для высоких и средних доз препаратов отмечался дозозависимый эффект. Поскольку считается доказанным, что отвечающая популяция Т-лимфоцитов селезенки имеет фенотип CD4+ (хелперы), следовательно, препараты данных групп обладают Т-лимфотропным ингибирующим действием на Т-хелперы. Кроме того, опираясь на общеизвестный факт, что высокие дозы ConA индуцируют образование супрессоров фенотипа CD8+, подавляющих пролиферацию других Т-клеточных субпопуляций при супраоптимальной дозе митогена, можно предположить и прямое воздействие препаратов данных групп на Т-супрессоры, либо на выработку лимфокинов, способствующих их образованию и функционированию (рис.6: цифры 1,2,3,4 обозначают дозы ConA 0,25,10 и 5 мкг/мл соответственно).

Причем, необходимо отметить, что эффекты воздействия исследуемых веществ на пролиферирующие тимоциты интактных мышей сохранялись при изменении условий опыта: при посадке клеток после введения препаратов in vivo (рис.7: цифры 1 и 4, 2 и 5, 3 и 6 обозначают контроль, внесение ГР-3 и ВМ-2-84 соответственно), а также при преинкубации препаратов с тимоцитами (рис.8).

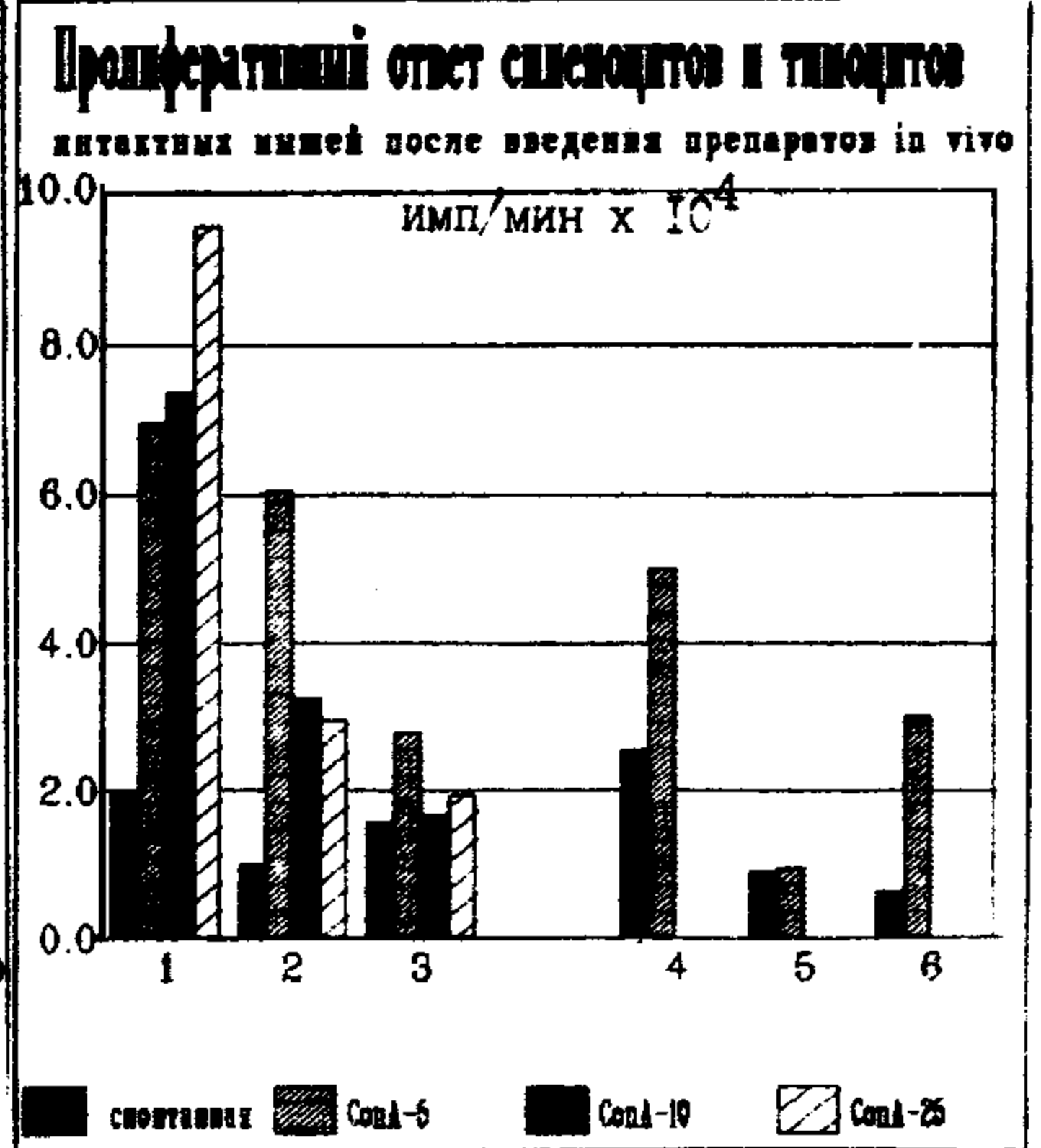
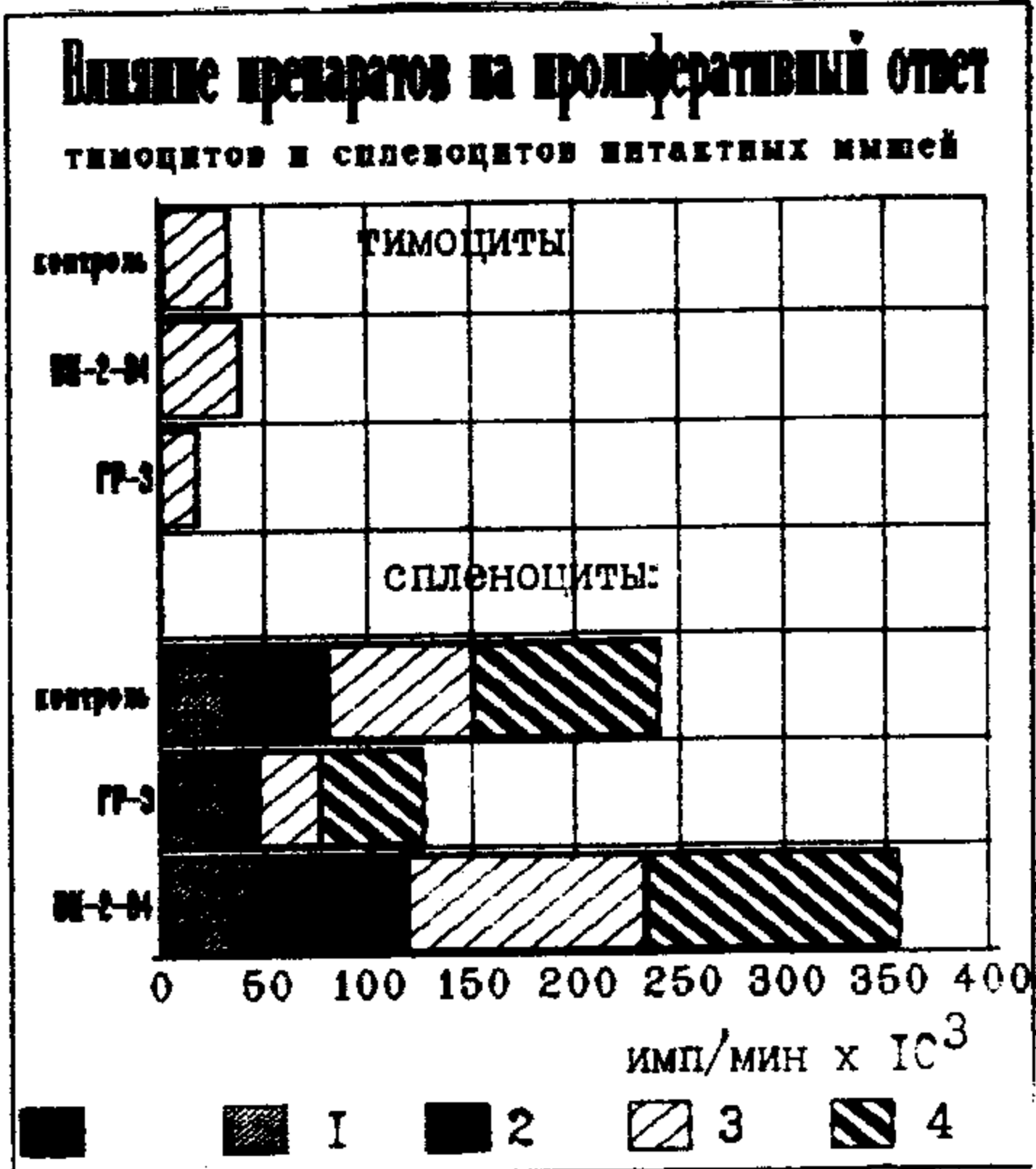
Так как препараты проявляют активность in vivo при РТИХ-индуцированном аутоиммунном заболевании, то было проведено тестирование в СКЛ. Пара отвечающих и стимулирующих клеток была подобрана как аналог процесса, индуцированного in vivo у мышей-гибридов (С57В1/6 х DBA/2)F1 введением им лимфоцитов родительской линии DBA/2. Соотношение клеток в СКЛ изменялось в зависимости от задач исследования: стандартное (2:1), при котором достоверного влияния препаратов на данную пару респондеров/стимуляторов не выявлено, и два других соотношения - избыток респондеров 5:1, и избыток стимуляторов 1:5, что стимулирует различные клеточные субпопуляции к пролиферативному ответу на полуаллогенные клетки в СКЛ.

При избытке респондеров пролиферируют Т-лимфоциты фенотипа



Рисунок 6.

Рисунок 7.



CD5+ (клетки Ly1), которые хорошо стимулируются производным индолил-3-ацетата. При избытке стимуляторов Т-лимфоциты экспрессируют фенотип CD8+, и вещество германийорганической природы достоверно подавляет пролиферацию именно этих клеток (фактически супрессорного фенотипа) - рис.9.

Таким образом, есть прямая связь между Т-лимфотропным подавляющим действием препаратов данных групп *in vivo* и *in vitro*.

ИССЛЕДОВАНИЕ IN VITRO МЕХАНИЗМОВ ИММУНОТРОПНОГО ДЕЙСТВИЯ ПРЕПАРАТОВ НА ЛИМФОЦИТЫ МЫШЕЙ С ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫМ НЕФРИТОМ НА РАЗЛИЧНЫХ СРОКАХ ЗАБОЛЕВАНИЯ

Т-лимфотропное действие препаратов является очень важным для дальнейшего изучения механизма их воздействия на клетки мышей с РТПХ-индуцированным СКВ-подобным заболеванием. Известно, что Т-лимфоциты играют комплексную роль в развитии аутоиммунных заболеваний: они регулируют продукцию аутоантител и принимают участие в клеточно-опосредованных аутоиммунных реакциях. CD4+ Т-клетки представляют главную клеточную популяцию, участвующую в аутоиммунных реакциях. Исследования на моделях показали роль TH1 в реакциях ГЭТ, а TH2 - при аутоиммунной патологии, в частности, системная склеродермия и СКВ могут быть описаны как TH2-болезни (Miossec P., 1993).

Исследование влияния соединений на пролиферативную активность тимоцитов мышей с ГН на различных сроках заболевания выявило, что вещество ВМ-2-84 не оказывало достоверного эффекта на тимоциты мышей на 5-ом месяце болезни, зато на 9-ом месяце зарегистрировано достоверное повышение пролиферации при оптимальной дозе митогена. Препарат ГР-3 стимулировал пролиферативный ответ при субоптимальной дозе митогена (рис. 10). Это можно интерпретировать как аналог лечебного эффекта, зарегистрированный в системе *in vitro*, так как в процессе формирования РТПХ-индуцированного СКВ-подобного синдрома наблюдается массивная дисплазия тимуса (Chayur Tarig, Th. Seemaeyer A., 1988). Для спленоцитов эффекты аналогичны.

Нами было выдвинуто предположение о преимущественном влиянии субстанции ВМ-2-84 на Т-клетки хелперной природы, а ГР-3 - супрессорной. Известно, что TH2 пролиферируют под воздействием IL-1, а киллеры фенотипа Thy1,2+CD4-CD8- реагируют на IL-2, причем, высокие дозы IL-2 стимулируют супрессоры того же фенотипа. При использовании rIL-1 и rIL-2 в качестве стимуляторов клеточной пролиферации получены следующие данные: производное индолил-3-ацетата по-

Рисунок 8.

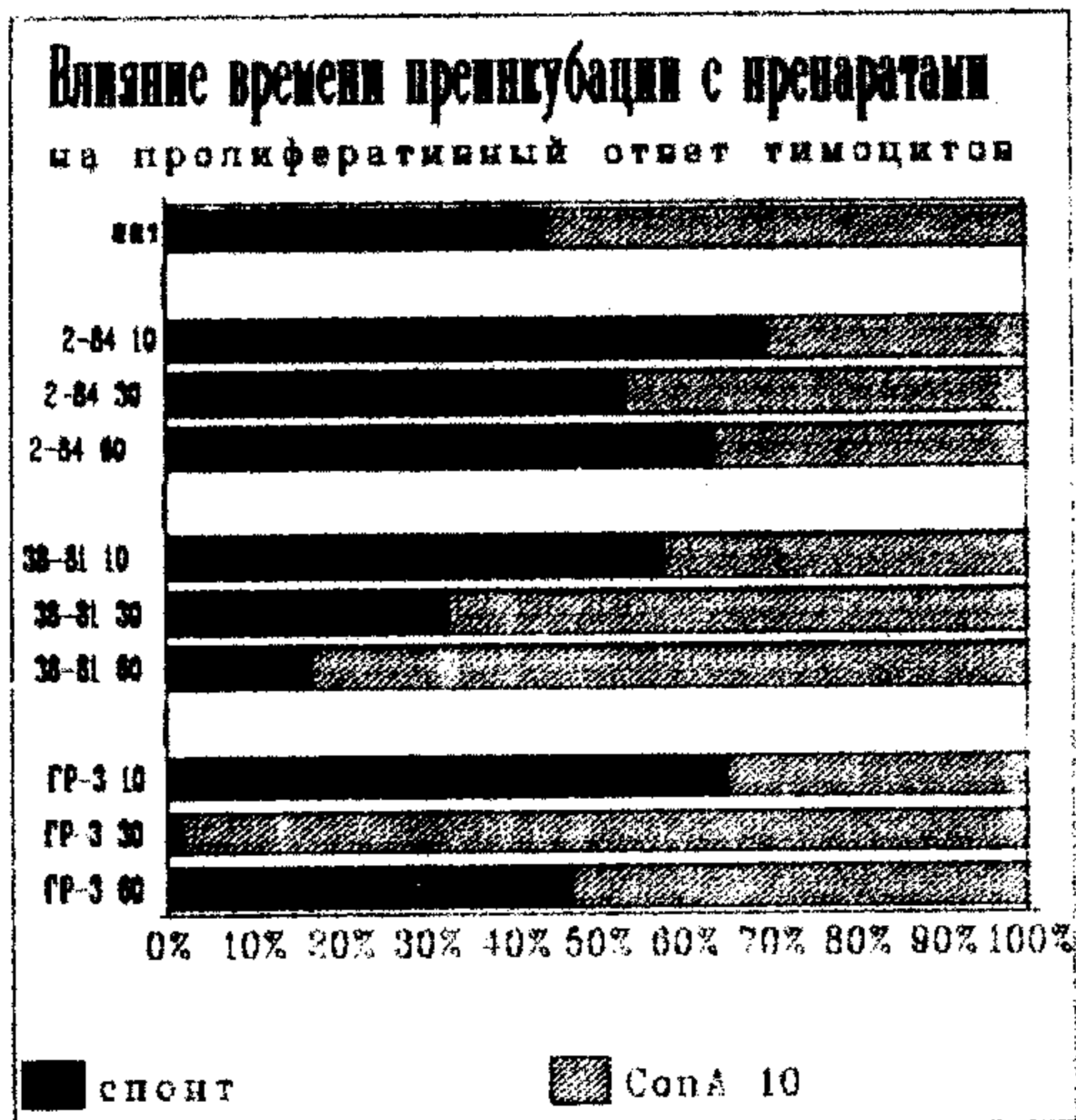


Рисунок 10.

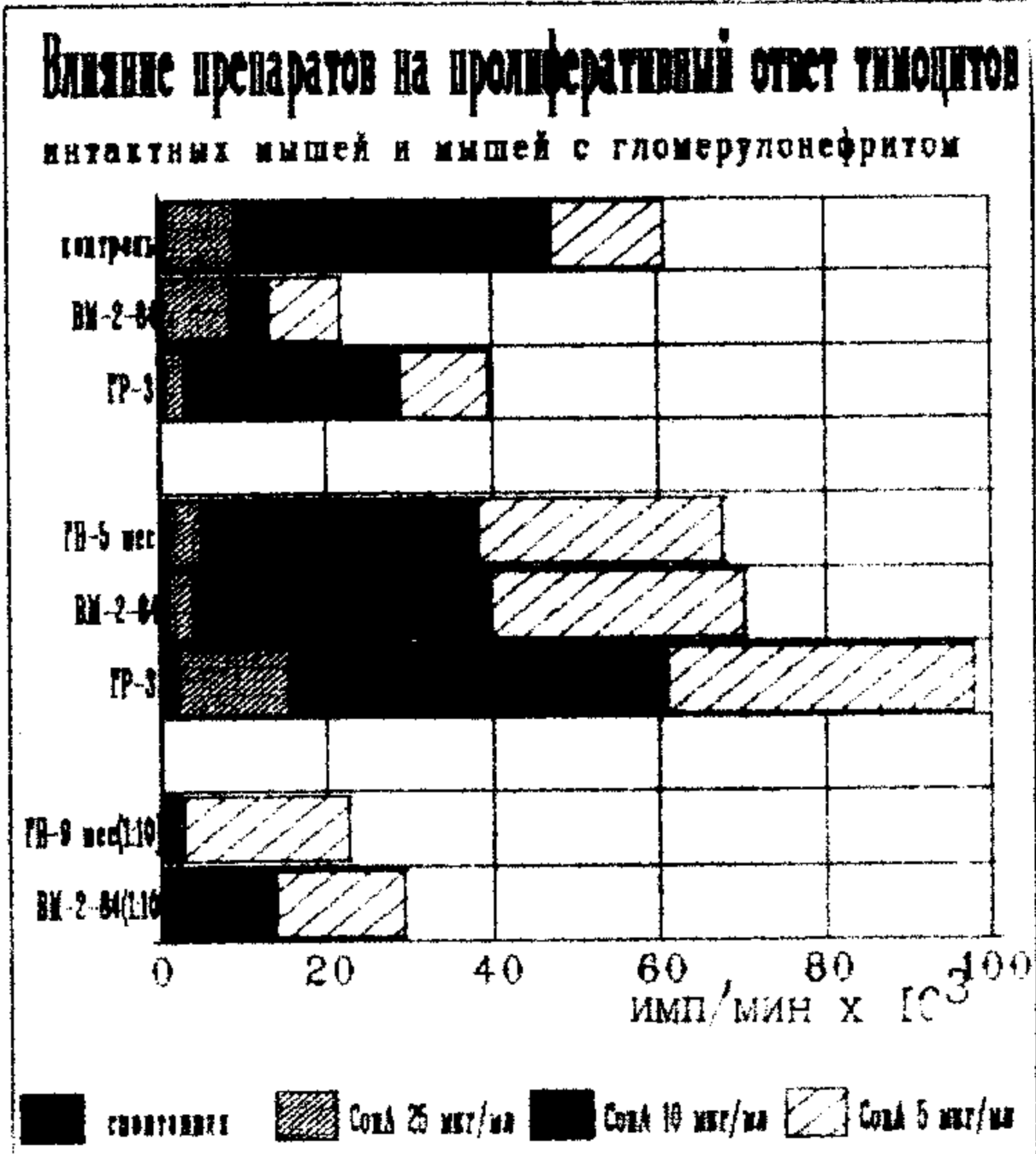


Рисунок 9.

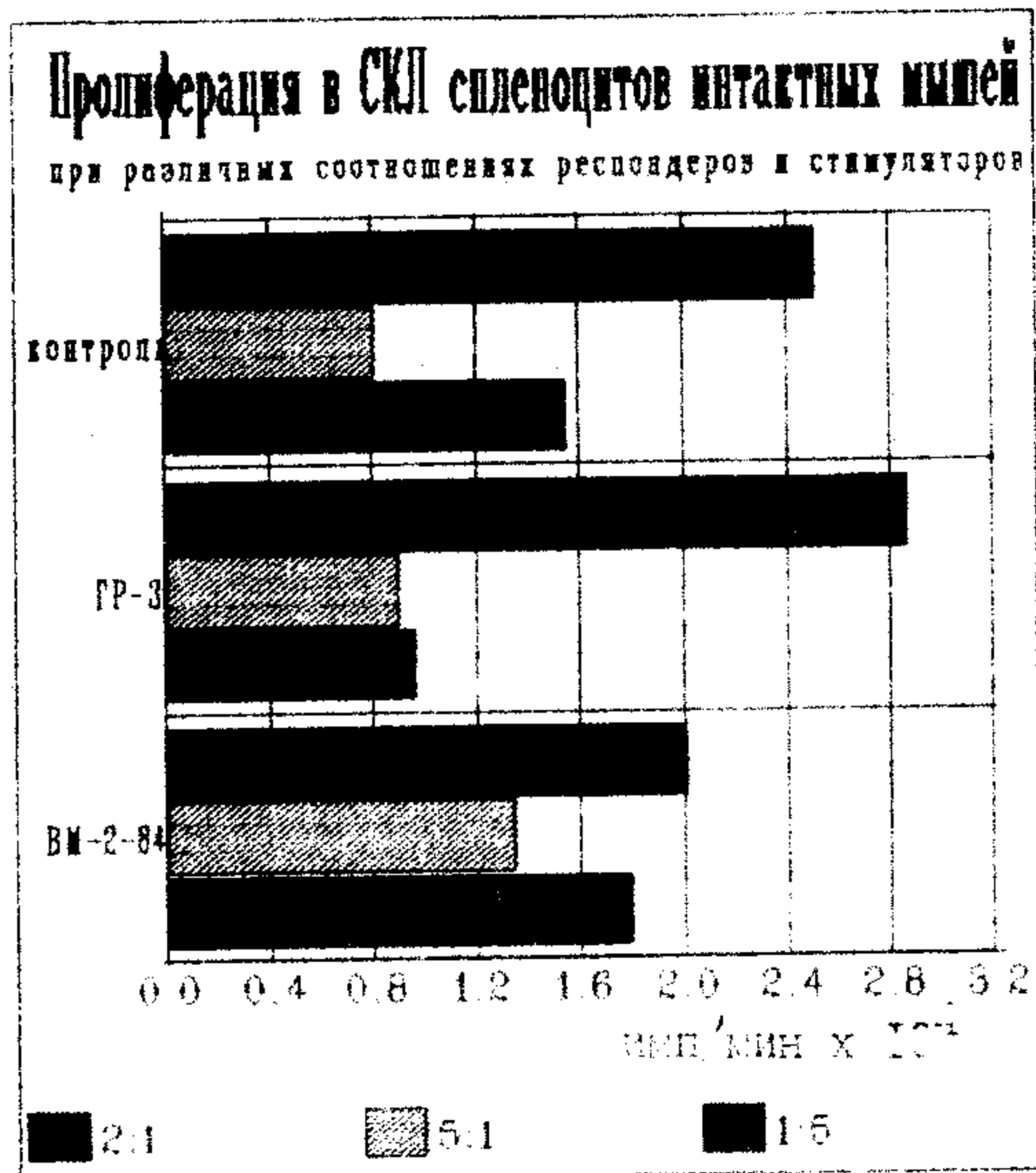
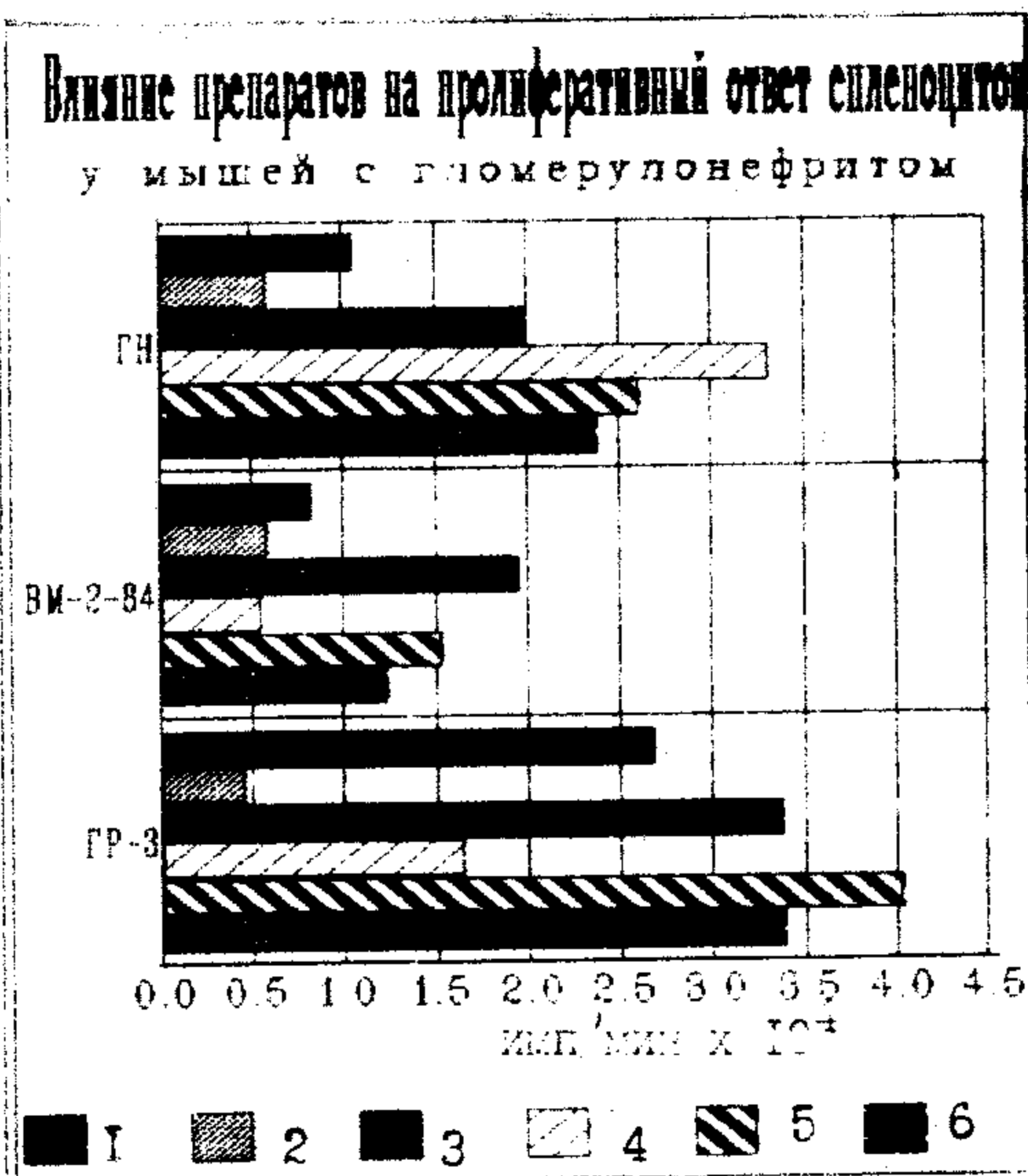


Рисунок 11.



давляет пролиферативный ответ на rIL-1, следовательно, этот препарат действует преимущественно на TH2, с чем и связан его лечебный эффект *in vivo* у мышей с РТПХ-индуцированным аутоиммунным синдромом, в развитии которого ведущая роль принадлежит именно этому клону клеток. Соединение германийорганической природы на эту клеточную субпопуляцию достоверного влияния не оказывает.

На клетки, пролиферирующие под воздействием rIL-2, и имеющие киллерный/супрессорный фенотип, влияние оказывают как раз вещества германийорганической природы: при ГН эта субпопуляция стимулируется, чем и может определяться лечебный эффект вещества ГР-3 на предложенной нами модели СКВ, где супрессорная функция является подавленной, тогда как соединения алканкарбоновой природы на данную клеточную субпопуляцию влияния не оказывают (рис.11: цифрами 1-6 обозначена спонтанная пролиферация, ConA 10мкг/мл, IL-1 и IL-2 в дозе 1000, 100 и 10 ед/мл соответственно).

В результате тестирования влияния препаратов на LPS-индуцированную пролиферацию и дифференцировку клеток с последующим синтезом IgG *in vitro*, обнаружено, что у мышей с ГН на 5-ом месяце болезни стимулируется спонтанная пролиферация и ответ на LPS (рис.12). При исследовании синтеза антител *in vitro* выявлено повышение спонтанного и LPS-стимулированного синтеза IgG при ГН на 5-ом месяце болезни препаратами обеих групп, что связано либо с истощением функции TH2 и стимуляцией небольших количеств TH1 к тесному Т-В-клеточному взаимодействию (в отношении ВМ-2-84), либо со стимуляцией Т-супрессоров указанного выше фенотипа (в отношении ГР-3) с последующей продукцией В-клетками иммуноглобулинов класса IgG. Поскольку, увеличение IgG коррелировало с лечебным эффектом *in vivo* и стимулировалось другой субпопуляцией TH, то мы выдвинули предположение, что вновь образованные иммуноглобулины являются антиидиотипическими к синтезированным, благодаря поликлональной активации В-клеток во время хронической РТПХ (рис.13).

ИССЛЕДОВАНИЕ IN VITRO ЭФФЕКТА ВЛИЯНИЯ ИММУНОМОДУЛИРУЮЩИХ
СРЕДСТВ НА РАЗЛИЧНЫЕ СТАДИИ АКТИВАЦИИ Т- И В-ЛИМФОЦИТОВ
ИНТАКТНЫХ И БОЛЬНЫХ МЫШЕЙ

Анализировалось влияние препаратов на пролиферирующие клетки в зависимости от времени внесения их в культуру клеток. Выявлено, что при внесении их к тимоцитам интактных мышей одновременно с митогеном (0 час), достоверно подавляющий эффект наблюдался только у ГР-3. Через 24 часа эффекта не наблюдалось. При ГН наблюдались

Рисунок 12.

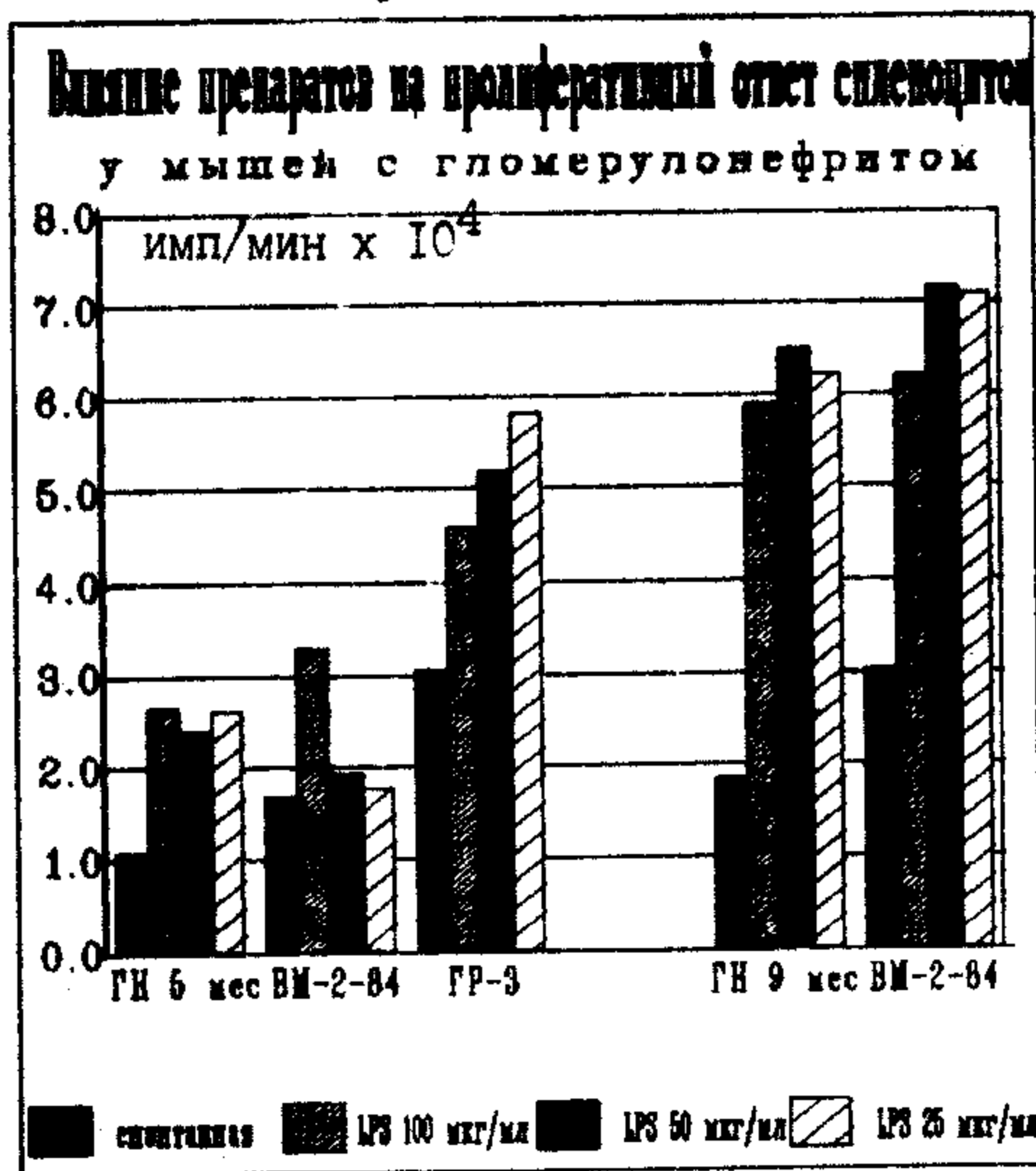


Рисунок 14.

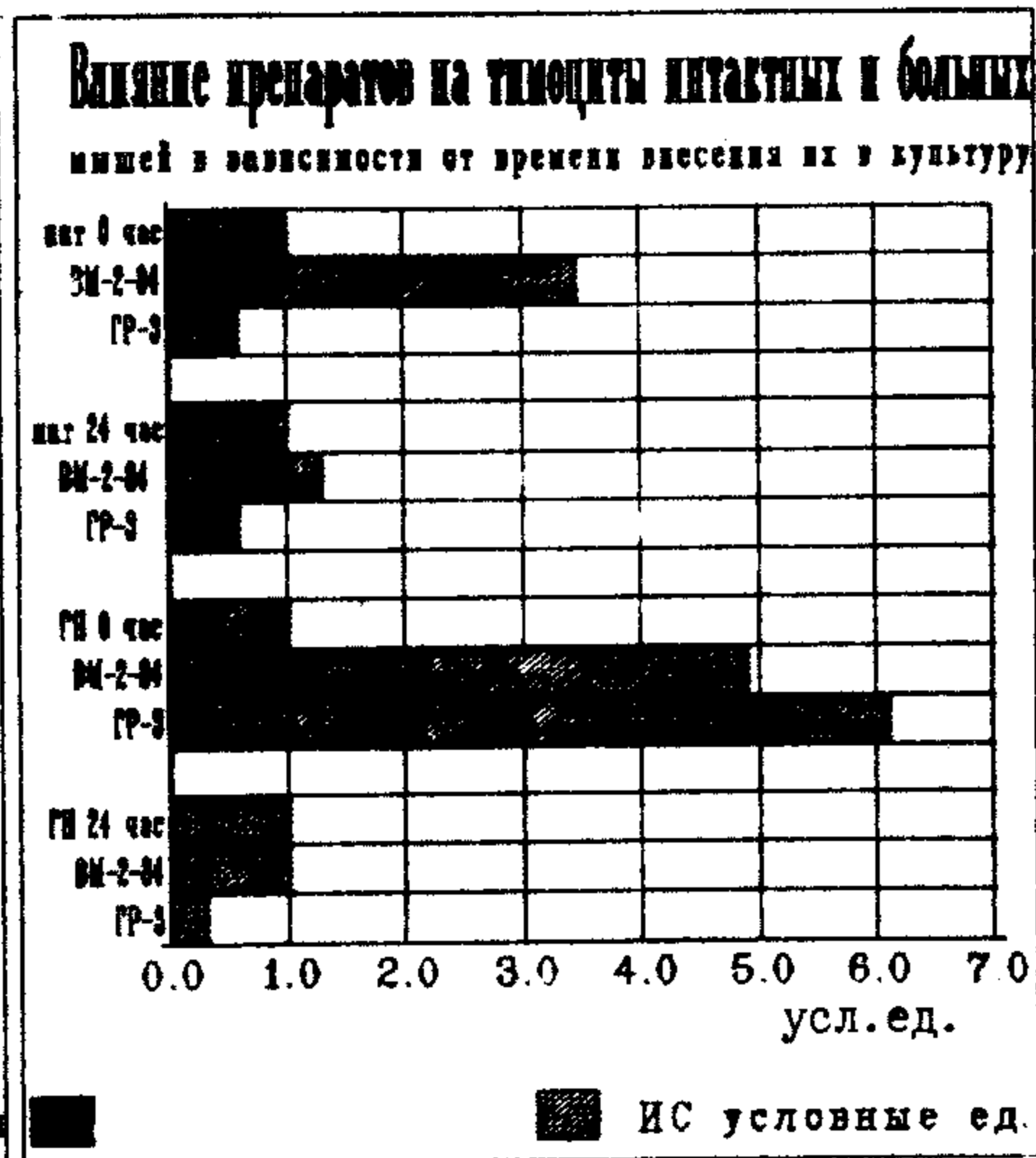


Рисунок 13.

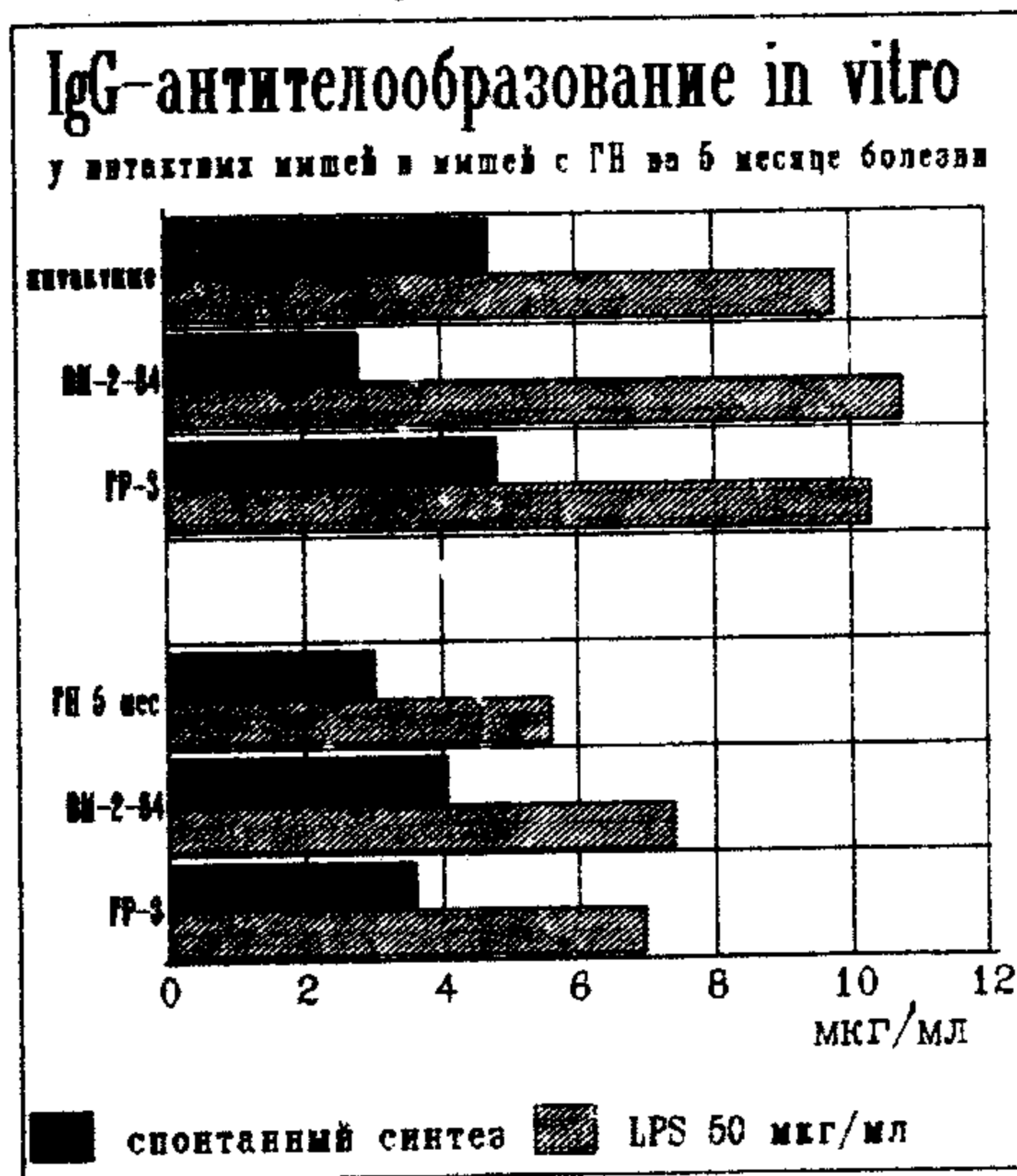
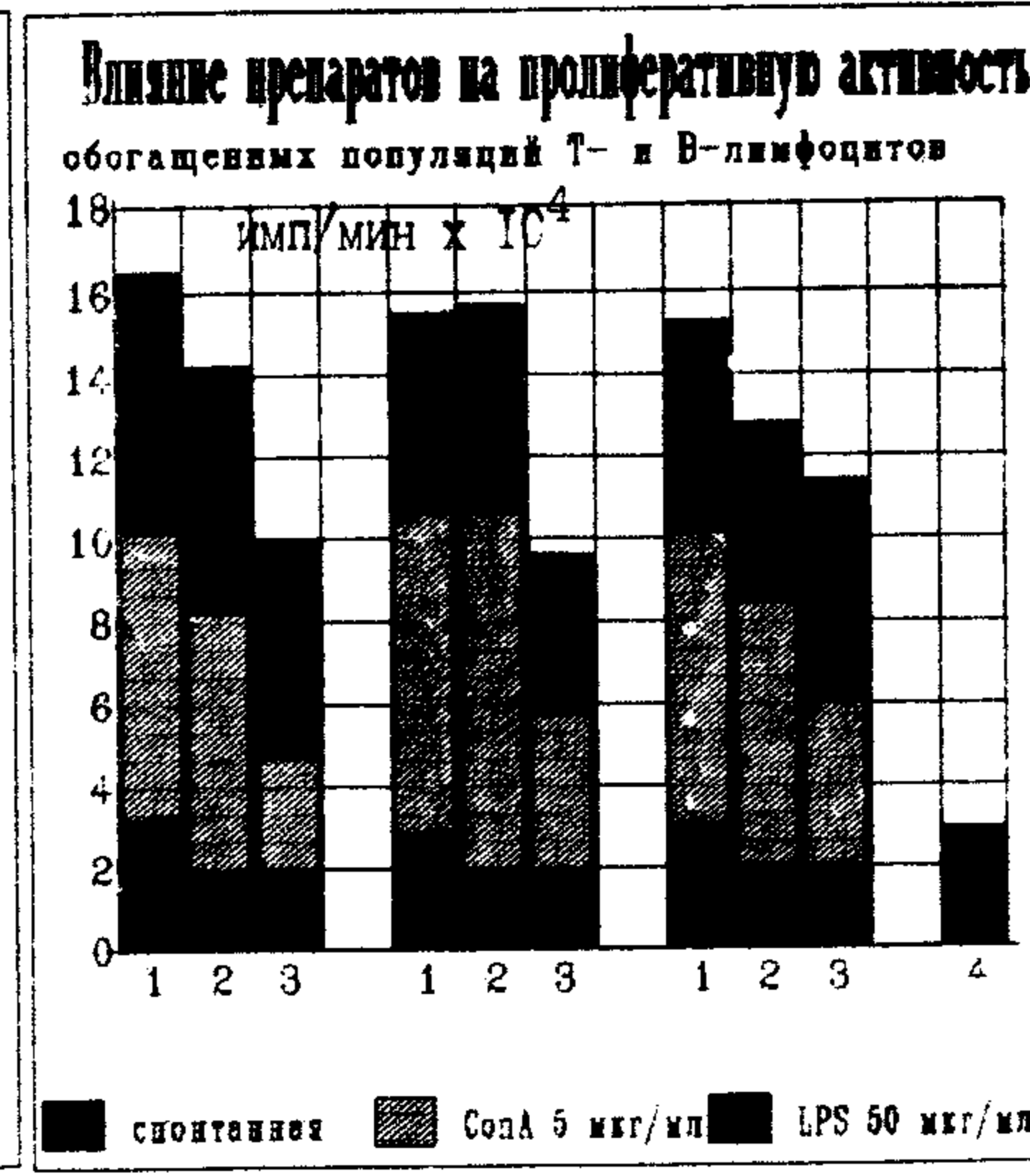


Рисунок 15.



другие эффекты: в 0 час ВМ-2-84 стимулирует пролиферацию при супраоптимальной дозе митогена, а ГР-3 что подавляет пролиферативный ответ при супраоптимальной дозе митогена. Внесенный через 24 часа, препарат германийорганической природы по-прежнему влияет на супрессоры (согласно поздним срокам их активации), стимулируя их в спонтанно пролиферирующей культуре (рис.14). Для спленоцитов эффекты аналогичны.

Установлено, что на Т-клетки в очищенной субпопуляции спленоцитов интактных мышей вещества влияют следующим образом: в 0 часов ингибируют пролиферативный ответ (ВМ-2-84 достоверно, а ГР-3 - нет), а через 24 и 48 часов влияние обоих соединений достоверно ингибирующее. На очищенную популяцию В-клеток препараты влияют следующим образом: только через 24 часа от начала культивирования оба препарата оказывают достоверный супрессивный эффект. Вероятно, действие препаратов на В-клетки реализуется только в постмитотическую фазу через ТН1 (рис.15: цифрами 1,2,3 обозначены контроль и внесение ГР-3 и ВМ-2-84 в 0 час, через 24 и 48 час. соответственно, цифрой 4 - контроль пролиферации с ConA для В-лимфоцитов).

МЕХАНИЗМЫ ДЕЙСТВИЯ ИММУНОМОДУЛЯТОРОВ ЦИКЛОСПОРИНА А И ИНДОМЕТАЦИНА ПРИ ВНЕСЕНИИ ИХ К РАЗДЕЛЕННОЙ КУЛЬТУРЕ ПРОЛИФЕРИРУЮЩИХ Т-КЛЕТОК

Полученные данные позволяют считать соединения ВМ-2-84 и ГР-3 Т-лимфотропными иммуноактивными веществами.

Однако, эффекты их воздействия необходимо было сравнить с эффектами уже известных иммуномодуляторов, успешно применяемых в клинике внутренних болезней (в том числе для лечения аутоиммунной патологии). Сравнение проводилось с индометацином и циклоспорином А.

Индометацин относится к нестероидным противовоспалительным средствам. Хорошо изучено его стимулирующее митогенез действие за счет подавления циклооксигеназного пути окисления арахидоновой кислоты, и, следовательно, снижение синтеза PGE₂. Известно и другое: в зависимости от дозы и времени внесения в культуру индометацин может оказывать различные, в том числе и оппозитные, влияния на культуру пролиферирующих Т-клеток (Варфоломеев, 1985; Badger, 1982; Chonaib, 1988; Dominique, 1983). Внесенный в культуру пролиферирующих клеток в 0 час от начала культивирования, индометацин достоверного влияния не оказывает, через 4 часа он достоверно стимулирует пролиферативный ответ спленоцитов, аналогичное влияние

Рисунок 16.

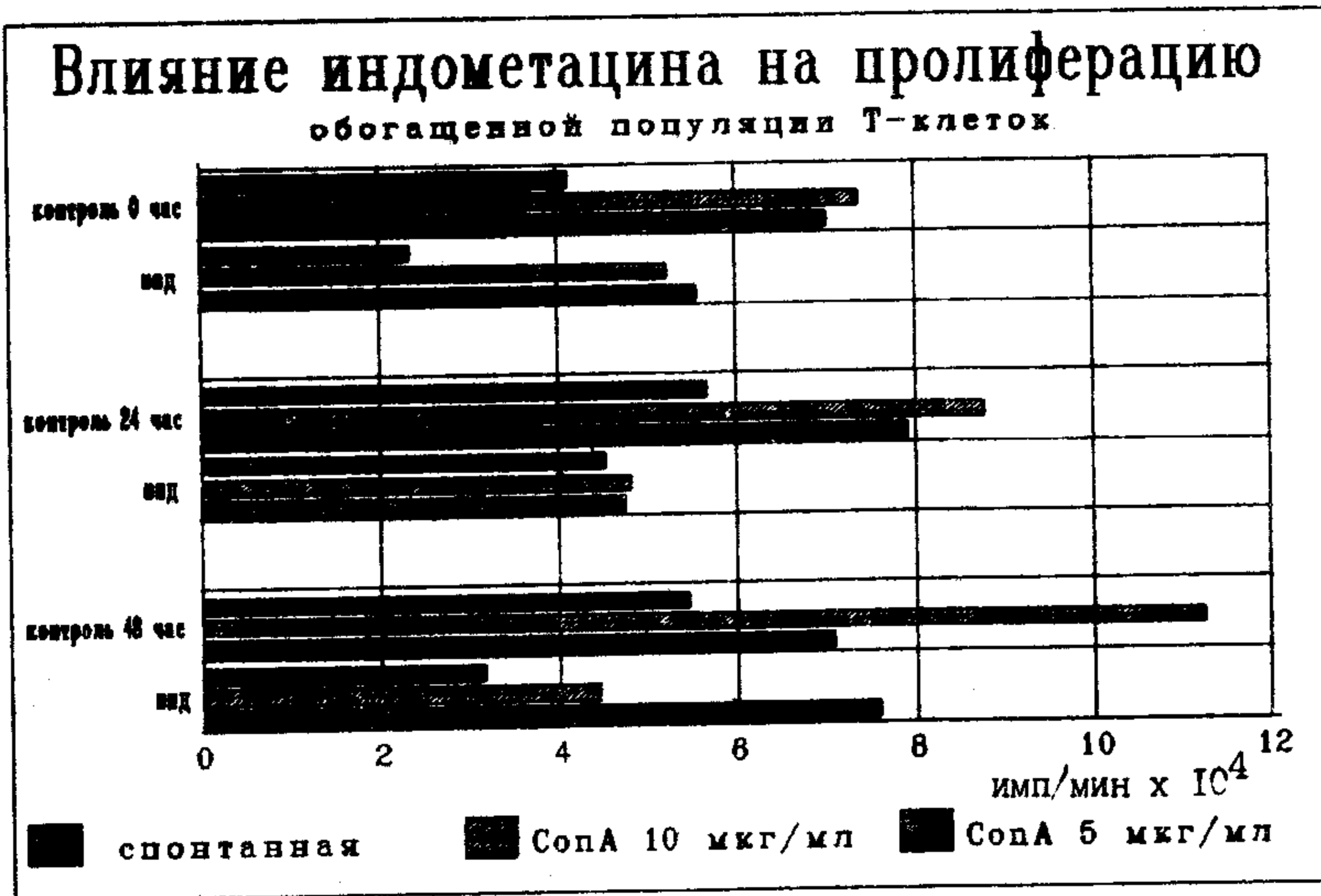
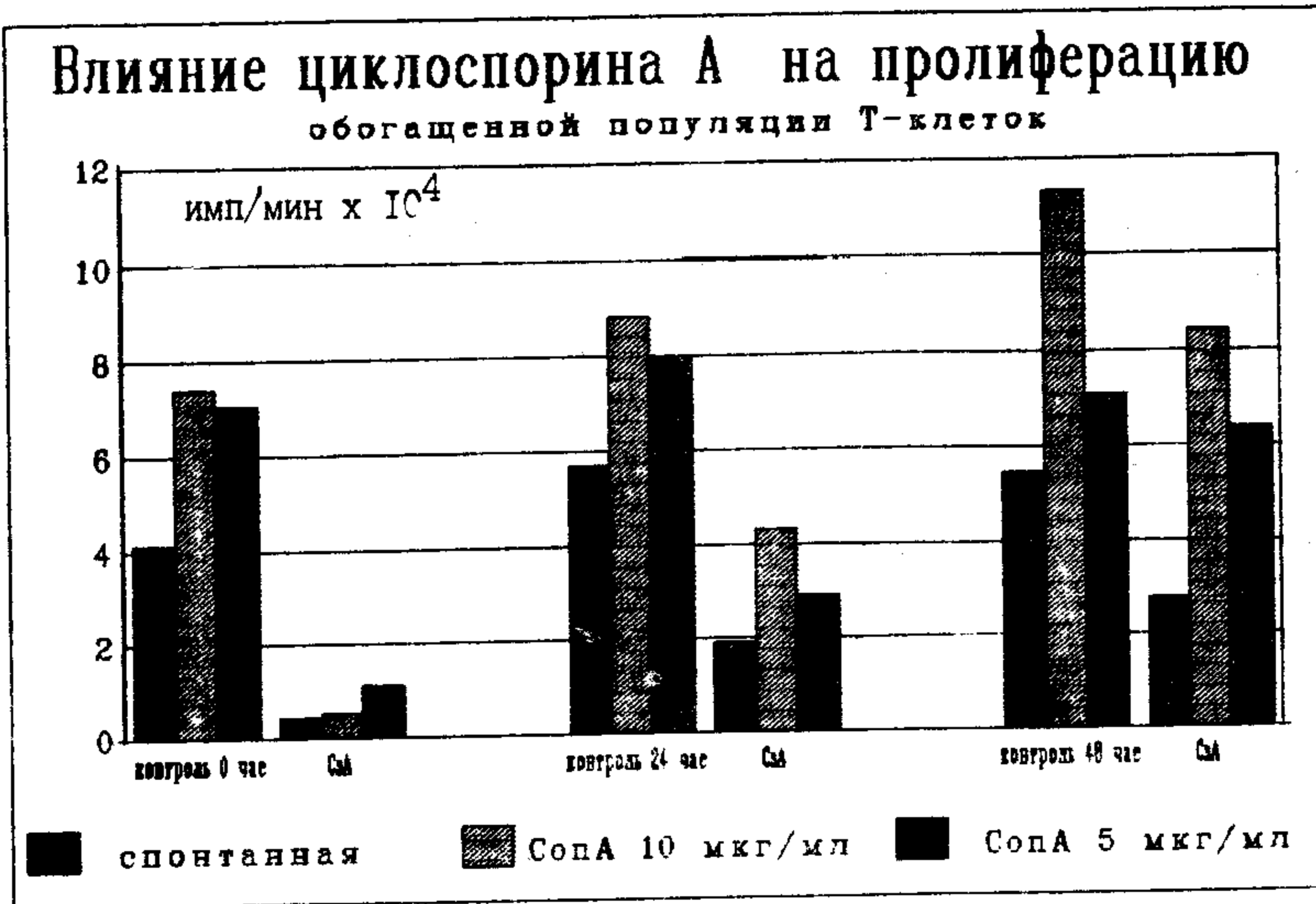


Рисунок 17.



зарегистрировано и через 24 и 48 часов. Стимулирующее влияние индометацина связано с супрессией эндогенных простагландинов, продуцируемых макрофагами (Farrar W.L., 1985).

Это отражается в наших результатах: пролиферация при оптимальной и субоптимальной дозах митогена в обогащенной популяции Т-клеток достоверно подавлялась индометацином, причем эффект сохранялся и через 24 часа, и, в меньшей степени, через 48 часов (рис.16).

Эффект другого хорошо известного иммуномодулятора - циклоспорина А - реализуется только при внесении в 0 час к пролиферирующим клеткам, через 24 часа он уменьшается наполовину, а через 48 часов становится недостоверным относительно контроля (рис.17). Это согласуется с литературными данными, что активационный сигнал к синтезу ДНК и пролиферации генерируется в момент перехода клетки из фазы G₀ в фазу G₁, и именно в этот промежуток времени происходит торможение циклоспорином А вступления клетки в клеточный цикл (Kimball P.K., 1991). Если CsA добавить в фазу G₁ клеточного цикла, то подавление пролиферации идет не так интенсивно, как в фазу G₀ (Harding M.W., 1989).

Таким образом, изучение эффектов производных АКК и ГОС позволяет считать, что они обладают иными механизмами иммуноактивного действия, отличающимися от индометацина и циклоспорина А.

Анализируя полученные результаты в целом, можно сказать, что изучаемые препараты оказывают влияние на патогенетические механизмы СКВ-подобного аутоиммунного синдрома: стимуляция тимоцитов при дисплазии тимуса, вызванной хронической РТПХ, подавление TH2 веществами алканкарбоновой природы и стимуляция супрессорных клеток веществом германийорганической природы, противовоспалительное действие, которое может реализоваться как посредством прямого воздействия на почки, так и путем влияния на IL-1-зависимый синтез IL-2. В эту же схему укладывается стимуляция IgG-антителогенеза клетками селезенки мышей с гломерулонефритом (как обсуждалось выше).

ВЫВОДЫ:

1. Производные алканкарбоновых кислот (АКК) и германийорганические соединения (ГОС) обладают выраженными иммуотропными свойствами у интактных животных: стимуляция гуморального и подавление клеточного иммунного ответа в условиях *in vivo*; подавление спонтанной и митогениндуцированной пролиферации спленоцитов *in vitro*

под действием ConA и угнетении пролиферации в однонаправленной СКЛ.

2. Показано, что наибольший эффект обнаружен у соединения BM-2-84 (из трех производных АКК) и вещества GP-3 (из трех ГОС), заключающийся в степени выраженности и воспроизводимости их иммуноактивных свойств.

3. Механизм действия соединений достоверно отличается от известных иммуномодулирующих средств : индометацина, который в стандартных условиях опыта стимулирует пролиферативный ответ, а препараты его подавляют, и циклоспорина А, как ингибитора только ранних стадий Т-клеточной активации, тогда как эффект препаратов сохраняется через 4, 24 и 48 часов от начала воздействия.

4. Выявлено стимулирующее действие соединений GP-3 и BM-2-84 на пролиферацию Т-клеток в ответ на ConA и усиление пролиферации и дифференцировки В-лимфоцитов в ответ на LPS у больных мышей, что противоположно эффектам на интактных животных и свидетельствует о необходимости скрининга препаратов на здоровых и больных животных.

5. Введение соединения BM-2-84 животным с РТПХ-индуцированным Lupus-подобным нефритом оказывает выраженный терапевтический эффект, заключающийся в снижении протеинурии и положительной динамике результатов морфологического исследования почек.

6. Разработана система скрининга, включающая использование интактных животных *in vivo* и *in vitro*, а также экспериментальную модель РТПХ-индуцированного Lupus-подобного нефрита, адекватная для отбора эффективных соединений и коррекции нарушений, связанных с дисфункцией иммунной системы.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ.

1. О.П. Колесникова, О.Т. Кудяева, В.А. Логинов, А.Н. Мирскова, Г.Г. Левковская, М.Н. Тузова, Т.Г. Сухенко, В.А. Козлов. Иммуноактивные и противовоспалительные свойства производных серосодержащих алканкарбоновых кислот у интактных и больных иммунокомплексным гломерулонефритом и прогрессирующим иммунодефицитом мышей // Патогенез хронического воспаления. Тез. докл. - Новосибирск, 1991. - С. 89.

2. О.П. Колесникова, М.Н. Тузова, Т.Г. Сухенко, В.А. Козлов. Спонтанная, митоген- и антигениндуцированная пролиферация тимоцитов и спленоцитов, а также фагоцитарная активность макрофагов мышей под действием производных алканкарбоновых кислот и германийор-

германиевых соединений // 1 съезд иммунологов России. Тез. докл. - Новосибирск, 1992. - С. 231.

3. Л. В. Топоркова, О. П. Колесникова, М. Н. Тузова. Роль протеинкиназы С и cAMP-зависимой протеинкиназы при подавлении ConA-индуцированной пролиферации тимоцитов германийорганическими соединениями // 1 съезд иммунологов России. Тез. докл. - Новосибирск, 1992. - С. 482.

4. L. V. Toporkova, O. P. Kolesnikova, M. N. Tuzova. Early effects of germanium-organic compound on protein-kinase activity of inhibition of ConA-induced activation in murine thymocytes // Structure, function or regulatory polypeptides. Abstracts.- Moscow, 1992.- P. 82.

5. О. П. Колесникова, О. Т. Кудяева, М. Н. Тузова, Т. Г. Сухенко, В. А. Коэлов. Модель аутоиммунного заболевания. индуцированного реакцией "трансплантат против хозяина" // Лангмалогия.- 1993.- N 1.- С. 64.

6. В. С. Ширинский, О. П. Колесникова, О. Т. Кудяева, Т. Г. Сухенко, М. Н. Тузова, Н. В. Семенова. Иммуноактивные свойства трекрегана // Экспериментальная и клиническая фармакология.- 1993.- Т. 56.- N 3.- С. 42-45.

7. Тузова М. Н. Корректирующие эффекты новых иммуномодулирующих средств при аутоиммунном заболевании // Институт клинической иммунологии СО РАМН, научный отчет за 1993 г. Тез. докл. - Новосибирск, 1994. - С. 70.

8. О. П. Колесникова, О. Т. Кудяева, М. Н. Тузова, И. В. Сафронова, А. Н. Мирскова, Г. Г. Левковская, В. А. Коэлов. К вопросу о механизмах иммуномодулирующего эффекта производных алканкарбоновых кислот // Иммунология.- 1994.- N 5.- С. 30-33.

9. О. П. Колесникова, М. Н. Тузова, О. Т. Кудяева, И. В. Сафронова, А. Н. Мирскова, Г. Г. Левковская, В. А. Коэлов. Механизмы иммуномодулирующего эффекта германийорганических соединений // Иммунология.- 1995.- N 1.- С. 27-31.

Зак. 37. Тир. 100 экз. Печ. л. 1,25.
Формат 60 x 84/16. Бумага офсетная N1.
Тип. СО РАМН г. Новосибирск. 1995 г.