

ментопосредованного цитолиза Т-лимфоцитов с использованием моноклональных анти-Thy-1,2-антител [4, 9, 12]. Условия культивирования были аналогичны таковым в экспериментах с неразделенной культурой спленоцитов, стимулированных ЛПС.

За 4 ч до конца инкубации во все лунки добавляли по $3,7 \cdot 10^4$ Бк (1 мКи) ^3H -тимидина. По окончании инкубации клетки собирали на фильтры с помощью аппарата «Харвестер» (Titertek). Фильтры помещали во флаконы, содержащие сцинтилляционную жидкость (4 г дифенилоксазола и 0,1 г дифенилоксазолилбензола на 1 л толуола). Радиоактивность оценивали в жидкостном сцинтилляционном счетчике «Delta». Результаты выражали в импульсах включенного тимидина в минуту на $2 \cdot 10^5$ клеток. Оценка данных проводилась также с помощью индекса стимуляции (ИС) по формуле:
$$\frac{\text{имп/мин, опыт}}{\text{имп/мин, контроль}}$$

В качестве контроля использовали клеточную культуру, инкубированную без изучаемых соединений.

Влияние препаратов на антигенстимулированную культуру клеток исследовали в смешанной культуре лимфоцитов (СКЛ) [3]. В качестве респондеров использовали спленоциты мышей BALB/c, а в качестве стимуляторов пролиферации — спленоциты мышей СВА, облученные в дозе 2000 рад. Результаты оценивали так же, как в экспериментах с митогениндуцированной пролиферацией клеток.

Кроме этого, было оценено воздействие данной группы препаратов на IgG-антителообразование *in vitro*. В качестве объекта исследования использовали супернатант 7-суточной спонтанной и стимулированной ЛПС *E. coli* O55:B5 культуры мышинных спленоцитов, культивировавшихся в присутствии различных доз соединений и без них. Использовались интактные мыши F₁(C57BL/6 DBA/2), самки в возрасте 4—6 нед. Состав культуральной среды и оптимальная доза ЛПС аналогичны описанным выше. Растворы АКК вносили в лунки в конечных концентрациях 5 и 50 мкг на 1 мл среды одновременно с митогеном. Инкубацию клеточной культуры проводили в атмосфере 5% CO₂ при 37 °С в течение 7 сут. Каждую пробу повторяли в триplete. На 7-е сутки пробы в планшете ресуспендировали, триплеты объединяли и клетки осаждали двукратным центрифугированием при 3000 об/мин в течение 10 мин. Полученный супернатант разводили в соотношении 1:100, подобранным в предварительных опытах, и вносили в качестве исследуемого материала в заранее подготовленные микротитрационные платы для иммуноферментного анализа («Linbro»). Данные платы покрывали антителами против анализируемых иммуноглобулинов в количестве 0,2 мл на лунку (антитела кролика против IgG мыши; «Биос», Новосибирск) в натриевом карбонат-бикарбонатном буфере 0,1 М, рН 9,8. Сенсибилизирующую концентрацию устанавливали заранее, в данном случае она оставила 2 мкг/мл. Инкубацию платы проводили 4 ч при комнатной температуре и при 4 °С в течение ночи. Затем антитела удаляли интенсивным встряхиванием, платы промывали фосфатным буферным раствором 3 раза, а затем еще трижды дистиллированной водой, после чего подсушивали на бумажном фильтре. На следующем этапе проводили блокировку, для чего лунки платы обрабатывали 0,1% раствором желатина в фосфатном буфере по 0,3 мл на лунку с последующей инкубацией 1 ч при 37 °С, после чего плату отмывали по описанной выше схеме. Параллельно готовили стандартный раствор IgG для построения калибровочной кривой, для чего 1 ампулу стандартного IgG мыши с концентрацией иммуноглобулина 1 мг/мл доводили до концентрации 1 мкг/мл, из этого раствора готовили стандартные разведения 10, 20, 40, 60, 80, 100, 120 и 140 нг/мл. Стандарт вносили в лунки платы в количестве 0,2 мл на лунку, а оставшиеся лунки в плате заполняли исследуемыми образцами в разведении 1:100 в аналогичном объеме. Плату инкубировали 2 ч при 37 °С.

В дальнейшем платы обрабатывали пероксидазным конъюгатом антител кролика против цельной молекулы IgG мыши («Биос», Новосибирск) в разведении 1:50 по 0,2 мл на лунку и субстратом в количестве 0,2 мл на лунку (раствор ОФД в натрий-цитратном буфере 0,15 М, рН 5,0). Фермент-субстратную реакцию останавливали добавлением 3 М раствора серной кислоты в количестве 0,05 мл на лунку. От начала до остановки реакции проходил 1 ч при температуре 37 °С, после чего платы отмывали забуференным изотоническим раствором хлорида натрия с добавлением 0,05% твина-20. Интенсивность реакции оценивали по изменению окраски с помощью прибора «Мультискан» («Titertek») со светофильтром 492 нм.

Результаты и обсуждение. Внесение АКК в культуру спленоцитов в концентрации от 5 до 50 мкг/мл не оказывало существенного влияния

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 1994

УДК 615.276.4:547.58].015.46.07

О.П. Колесникова, О.Т. Кудяева, М.Н. Тузова,
И.В. Сафронова, А.Н. Мирскова,
Г.Г. Левковская, В. А. Козлов

К ВОПРОСУ О МЕХАНИЗМАХ ИММУНОМОДУЛИРУЮЩЕГО ЭФФЕКТА ПРОИЗВОДНЫХ АЛКАНКАРБОНОВЫХ КИСЛОТ

Институт клинической иммунологии СО РАМН, Новосибирск,
Институт органической химии СО РАН, Иркутск

Производные алканкарбоновых кислот (АКК), синтезированные Иркутским институтом органической химии СО РАН и в дальнейшем обозначенные символами VM-38-80, VM-38-81 и VM-2-84, обладают широким спектром биологической активности [1]. Скрининг этих соединений на различных моделях клеточного и гуморального иммунитета выявил выраженные иммуностропные свойства, что позволяет рассматривать данные вещества как потенциальные иммуномодуляторы [2]. Однако механизм их влияния на функции иммунокомпетентных клеток остается невыясненным.

Цель настоящей работы заключалась в изучении действия этих веществ на спонтанную и индуцированную митогенами и антигенами пролиферацию спленоцитов и тимоцитов мыши, а также в выявлении их влияния на Т- и В-клеточные звенья иммунной системы.

Методика исследований. В экспериментах использовали мышей BALB/c, F₁(C57BL/6 × DBA) [2] и F₁(CBA × C57BL/6) в возрасте 6—8 нед из питомника «Столбовая».

Спленоциты и тимоциты мышей получали в стерильных условиях [13]. Клеточную суспензию доводили до концентрации $2 \cdot 10^6$ клеток на 1 мл среды и помещали в 96-луночные планшеты для культивирования (завод биополимеров, Санкт-Петербург) по $2 \cdot 10^5$ клеток на лунку в среде RPMI-1640 (НПО «Вектор»), содержащей 10% эмбриональной сыворотки телят (НПО «Вектор»), 10 мМ HEPES, $4 \cdot 10^{-5}$ М 2-меркаптоэтанол («Sigma»), 2 мМ L-глутамин (НПО «Вектор»), 50 мкг/мл гентамицина. Оптимальная доза конканавалина А (КонА), оттитрованная в предварительных опытах, составила 10 мкг/мл среды для митогениндуцированной пролиферации клеток. Растворы АКК вносили в лунки в конечных концентрациях 5 и 50 мкг/мл как одновременно с КонА, так и через 24 и 48 ч от начала культивирования. Инкубацию клеточной культуры проводили в атмосфере с 5% CO₂ при 37 °С в течение 72 ч.

Оптимальная доза липополисахарида (ЛПС) *Escherichia coli* O55:B5 («Sigma»), оттитрованная в предварительных опытах, составила 100 и 50 мкг/мл. Растворы АКК в этих опытах вносили в культуру клеток одновременно с митогеном в конечной концентрации 5 мкг/мл, инкубацию проводили в атмосфере с 5% CO₂ при 37 °С в течение 5 сут.

Суспензию, обогащенную В-клетками, получали двумя путями: разделением клеток на нейлоновой вате и путем компле-

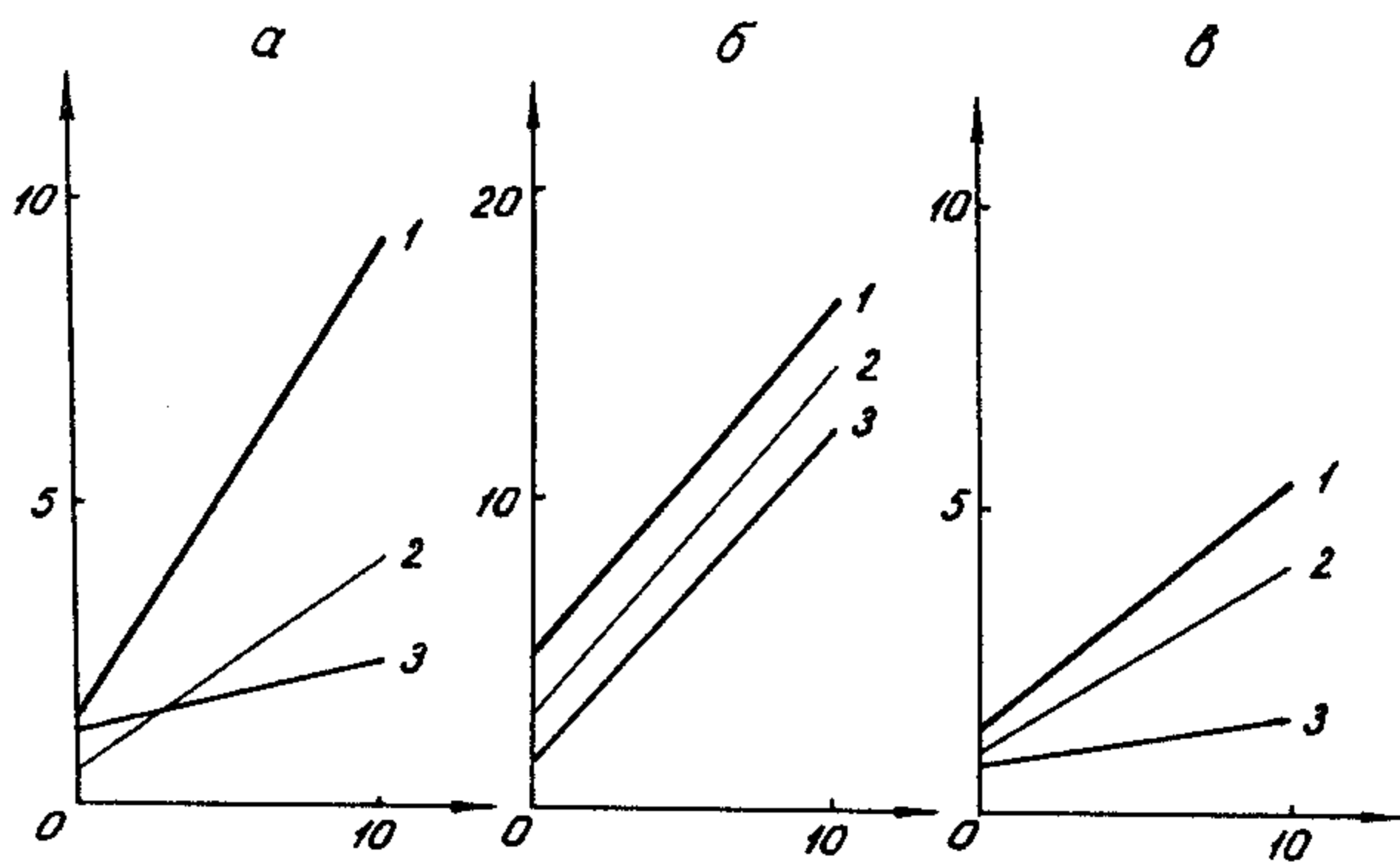


Рис. 1. Подавление пролиферации тимоцитов и спленоцитов мышей под влиянием АКК при использовании оптимальной дозы Кона.

По оси абсцисс — дозы Кона (10 мкг/мл); по оси ординат — количество, имп/мин · 10⁴.
 Проплиферация спленоцитов мышей F₁(CBA × C57BL/6) (а), F₁(C57BL/6 × DBA/2) (б) и тимоцитов F₁(C57BL/6 × DBA/2) (в). 1 — исходный уровень пролиферации; 2 — при добавлении VM-2-84 в дозе 50 мкг/мл; 3 — при добавлении VM-38-81 в дозе 50 мкг/мл.

нажизнеспособность клеток, оцененную по включению трипанового синего (87—97% контрольного уровня). Эти данные свидетельствуют о том, что препараты не оказывают прямого токсического воздействия на клетки. АКК снижают спонтанную пролиферацию спленоцитов и тимоцитов на 45—40% (рис. 1). При добавлении оптимальной дозы Кона к культуре спленоцитов подавление митоген-стимулированной пролиферации клеток носило дозозависимый характер (рис. 2). Как видно из рис. 1, ингибирующий эффект сохранялся независимо от видовой и органной принадлежности иммунокомпетентных клеток. Препараты VM-2-84 и VM-38-80 подавляли митогениндуцированную пролиферацию мышечных спленоцитов F₁(CBA × C57BL/6) на 50 и 30% (см. рис. 1, а), а пролиферацию спленоцитов мышей F₁(C57BL/6 × DBA/2) — на 10 и 20% (см. рис. 1, б; $p < 0,01$). Подавление тимоцитов мышей F₁(C57BL/6 × DBA/2) было более выраженным, чем спленоцитов, и составило 30—60% исходного уровня (см. рис. 1, в).

Данные о влиянии VM-2-84 на неразделенную субпопуляцию спленоцитов мышей, стимулированных ЛПС E. coli O55:B5, представлены на рис. 3, а: выраженный стимулирующий эффект

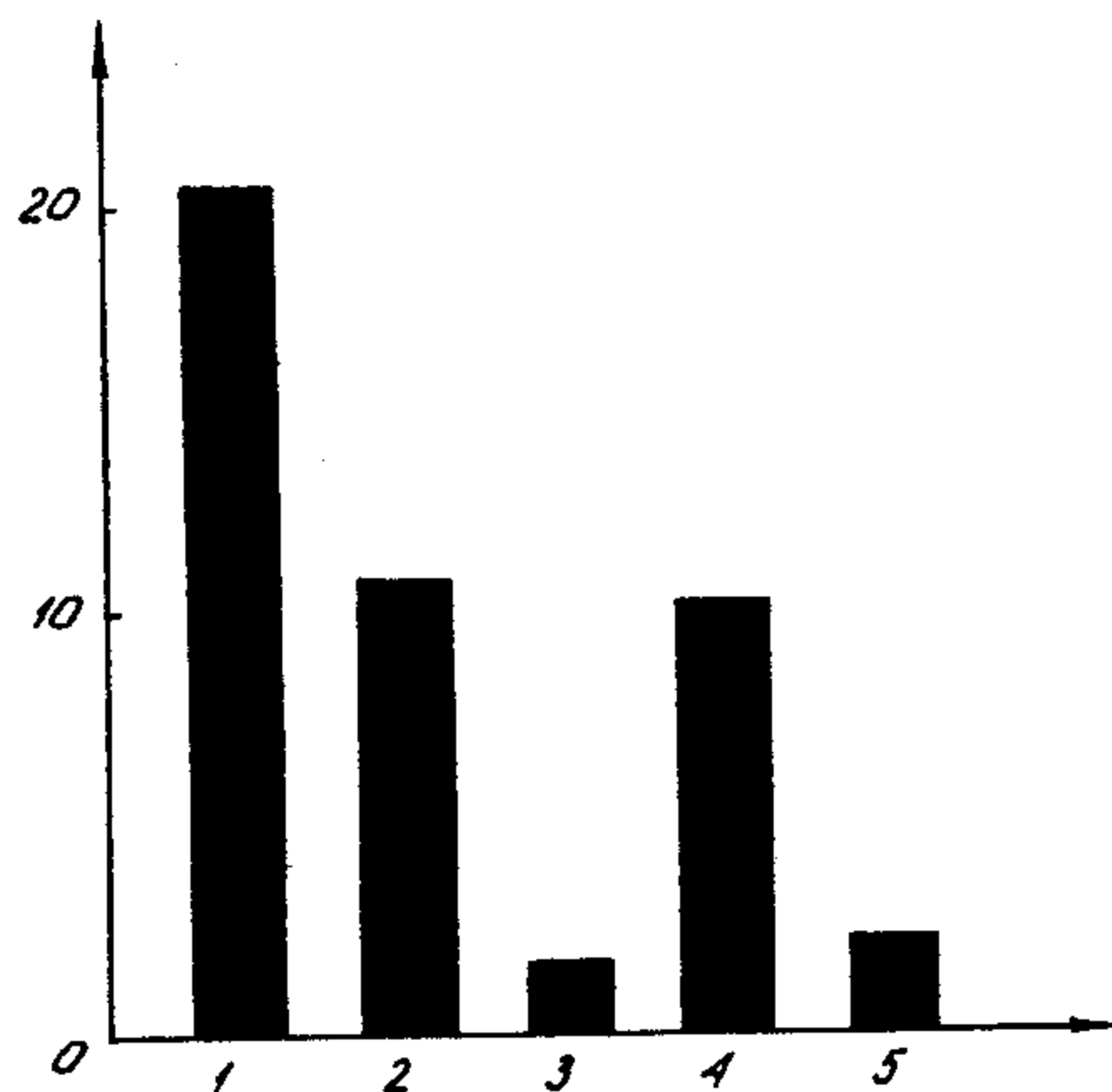


Рис. 2. Подавление митогениндуцированной пролиферации спленоцитов мышей F₁(C57BL/6 × DBA/2) при использовании оптимальной дозы Кона (10 мкг/мл) и различных доз АКК.

По оси абсцисс — 1 — исходный уровень пролиферации; 2 — VM-38-80, 5 мкг/мл; 3 — VM-38-80, 50 мкг/мл; 4 — VM-2-84, 5 мкг/мл; 5 — VM-2-84, 50 мкг/мл. По оси ординат — ИС.

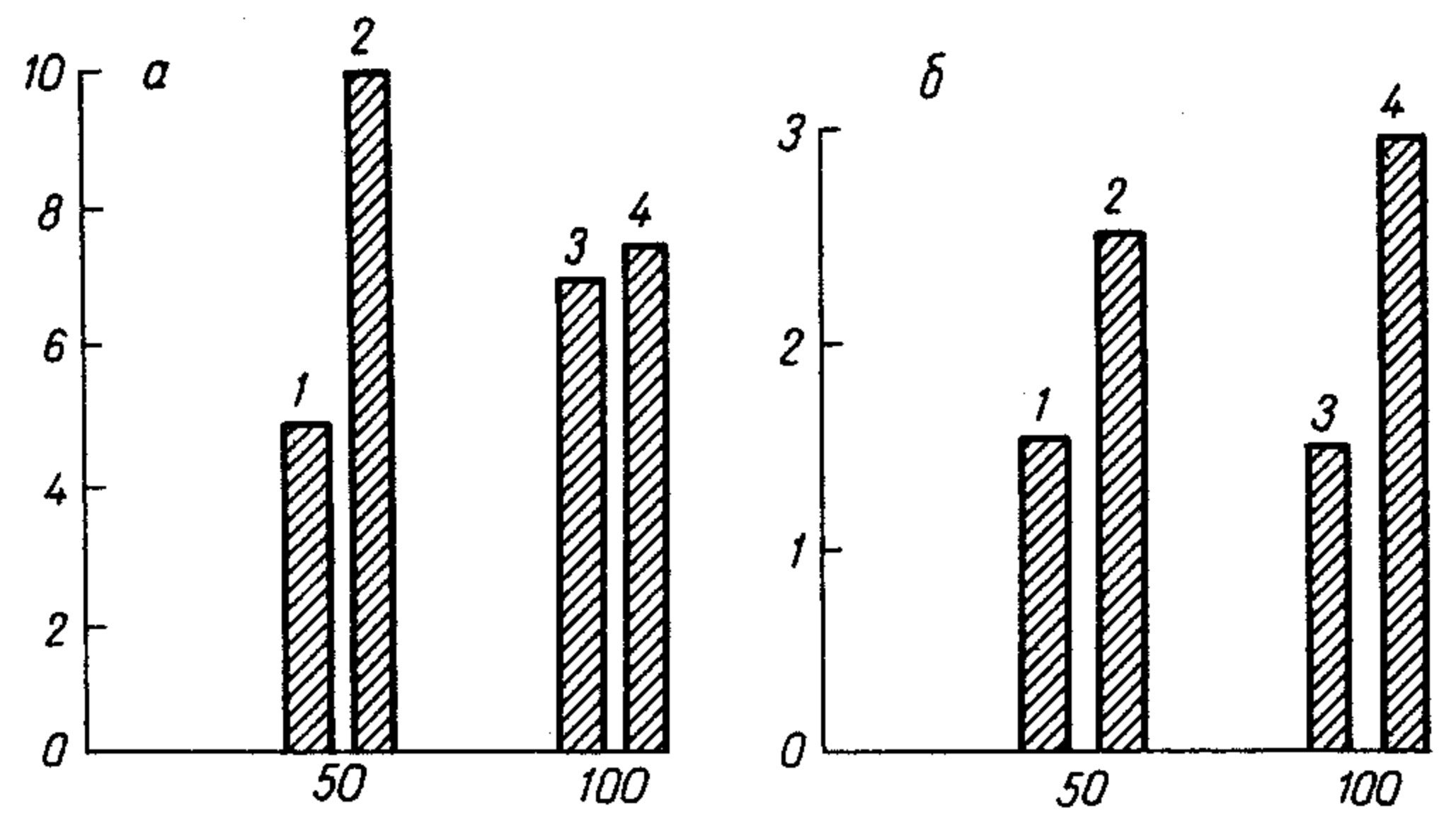


Рис. 3. Стимулирующее влияние VM-2-84 (5 мкг/мл) на ЛПС-индуцированную пролиферацию спленоцитов мышей F₁(C57BL/6 × DBA/2).

а — неразделенная культура спленоцитов; б — культура спленоцитов, обогащенная В-клетками.
 1 — ЛПС, 50 мкг/мл; 2 — ЛПС, 50 мкг/мл + VM-2-84; 3 — ЛПС, 100 мкг/мл; 4 — ЛПС, 100 мкг/мл + VM-2-84. По оси абсцисс — концентрация ЛПС, мкг/мл; по оси ординат — ИС.

(усиление в 2 раза) наблюдался в неразделенной культуре спленоцитов при дозе митогена 50 мкг/мл, тогда как при дозе 100 мкг/мл эффекта не наблюдалось. При использовании обогащенной В-клетками культуры лимфоцитов стимулирующий эффект отчетливо проявлялся при обеих дозах митогена (рис. 3, б), прирост пролиферации составил 39 и 45% ($p < 0,05$).

Данные, представленные на рис. 4, свидетельствуют о том, что препараты VM-2-84 и VM-38-80 в дозе 50 мкг/мл ингибируют антигениндуцированную пролиферацию клеток в смешанной культуре лимфоцитов. Максимальный эффект дает препарат VM-2-84, снижающий пролиферацию на 50% исходной СКЛ ($p < 0,05$).

Как видно из рис. 5, внесение АКК в культуру спонтанно делящихся клеток подавляло спонтанный синтез IgG, тогда как внесение их в культуру, стимулированную ЛПС, умеренно повышало его. Однако на фоне такого мощного поликлонального В-клеточного стимулятора, как ЛПС E. coli, небольшой прирост в синтезе иммуноглобулинов в абсолютных цифрах почти незаметен. При вычислении относительного показателя — отношения стимулированного синтеза к спонтанному — при-

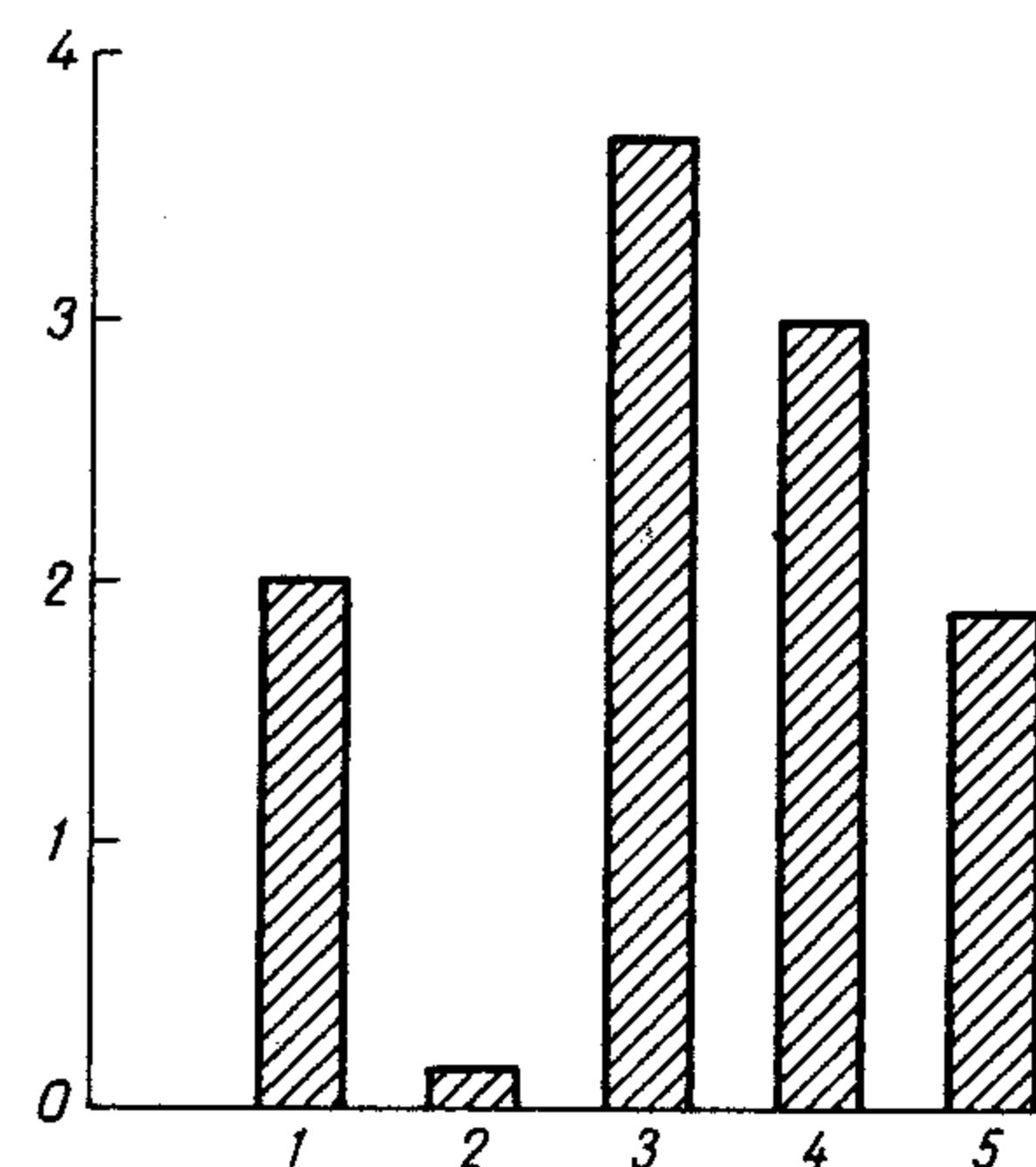


Рис. 4. Подавляющее влияние АКК (50 мкг/мл) на пролиферацию спленоцитов в СКЛ.

По оси абсцисс — 1 — клетки-респондеры; 2 — клетки-стимуляторы; 3 — СКЛ; 4 — СКЛ в присутствии VM-38-80; 5 — СКЛ в присутствии VM-2-84; по оси ординат — количество, имп/мин · 10⁴.

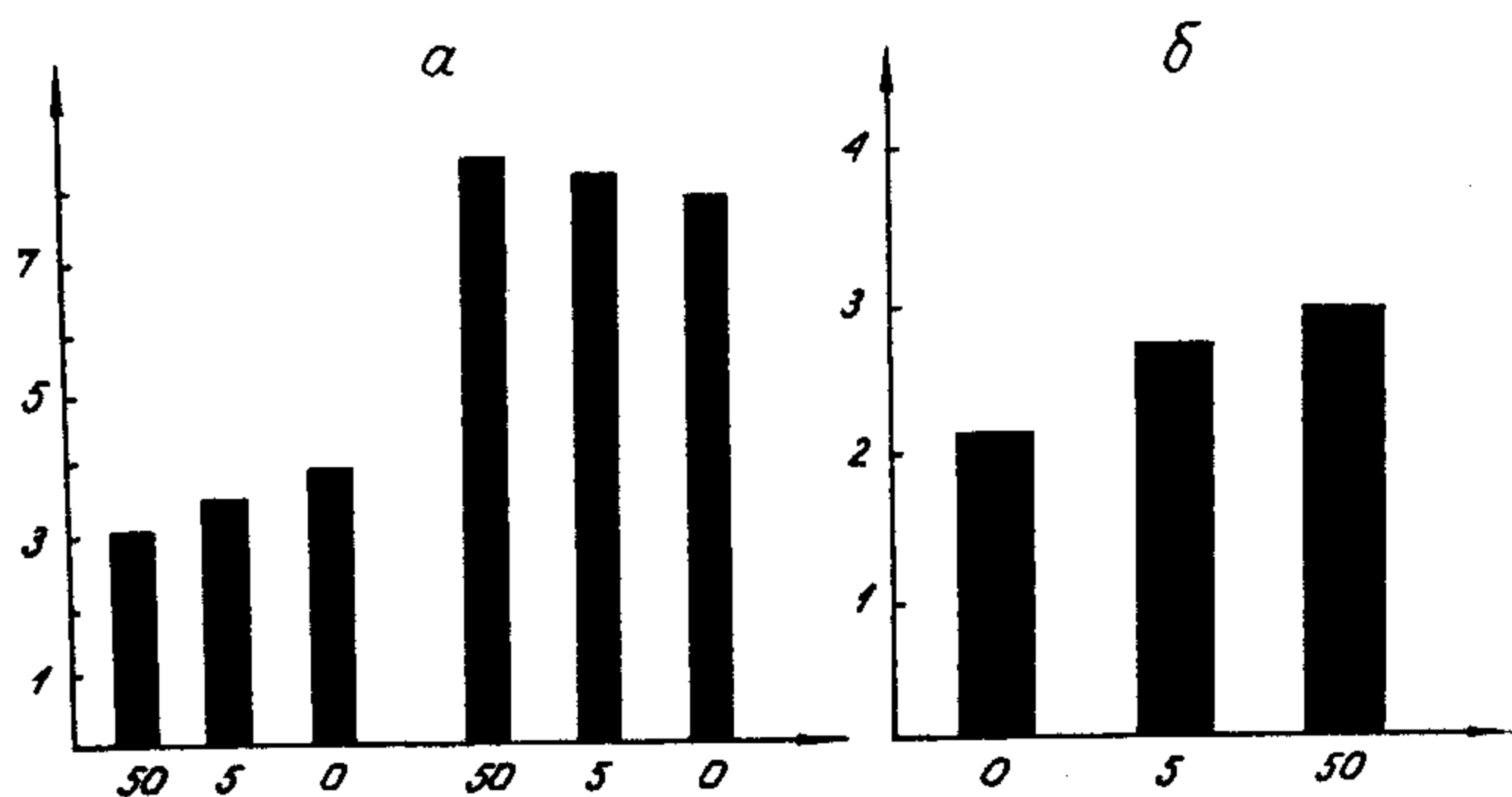


Рис. 5. Влияние различных доз VM-2-84 на спонтанный и ЛПС-стимулированный синтез IgG, выраженное в абсолютных (а) и относительных (б) единицах (концентрация ЛПС 50 мкг/мл).

По оси абсцисс — концентрация препарата, мкг/мл; по осям ординат: а — концентрация IgG, мкг/мл, б — ИС.

рост IgG-антител становился отчетливым и показывал выраженную дозовую зависимость. В сравнении с таковым без внесения препарата он составил от 25 до 30% в зависимости от дозы (рис. 6, а; $p < 0,01$).

В части опытов препаратом сравнения служил циклоспорин А («Sandoz»), заметно подавляющий Т-клеточную пролиферацию [8, 11]. Механизм действия циклоспорина А связан с подавлением продукции интерлейкина-2 (ИЛ-2) на ранних стадиях Т-клеточной активации [6, 7]. Для уточнения механизма действия АКК мы сравнивали их воздействие на спонтанную и митогениндуцированную пролиферацию клеток с эффектом циклоспорина А при внесении препарата в культуру в различные сроки от начала культивирования: одновременно с митогеном, через 24 и 48 ч от начала культивирования. Как видно из рис. 6, в отличие от циклоспорина А, действие которого проявляется только при внесении в культуру клеток одновременно с митогеном, АКК подавляли спонтанную и митогениндуцированную пролиферацию клеток и через 24, и через 48 ч от начала культивирования (с различной интенсивностью).

Подавление пролиферации, вызванное присутствием АКК, сразу после начала культивирования, сходное с эффектом циклоспорина А, позволяет предполагать, что один из механизмов ингибирующего воздействия на пролиферацию Т-клеток связан с подавлением продукции ИЛ-2 и экспрессии рецепторов ИЛ-2. Вместе с тем антипролиферативные свойства, наблюдаемые при внесении препарата в культуру через 24 и 48 ч, свидетельствуют о существовании других механизмов Т-лимфотропного действия.

Опираясь на наши данные, полученные *in vivo* [1, 2], можно расширить представления о механизме действия производных АКК: подавление реакции гиперчувствительности замедленного типа (ГЗТ), наблюдаемое под влиянием данной группы веществ *in vivo*, может свидетельствовать о прямом действии на Т-хелперы I типа [7] и, следовательно, может быть связано непосредственно с угнетением синтеза ИЛ-2, а угнетение продукции γ -интерферона этим клоном клеток приведет в свою очередь к усилению пролиферации В-лимфоцитов, что мы и наблюдаем при изучении ЛПС-стимулированной

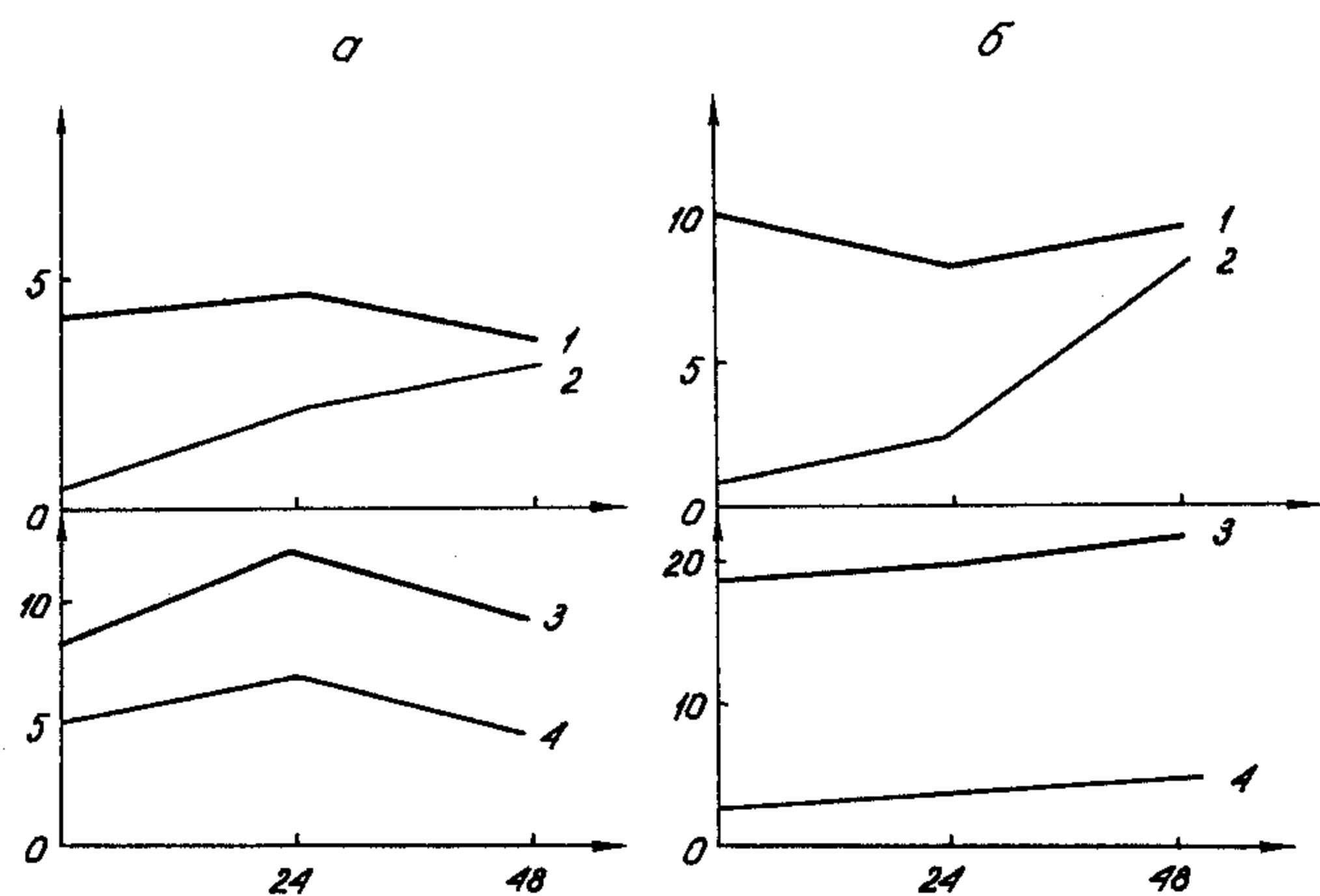


Рис. 6. Подавление спонтанной (а) и КонА-индуцированной (б) пролиферации под влиянием АКК, внесенных в различные сроки от начала культивирования в сравнении с циклоспорином А (доза КонА 10 мкг/мл, доза АКК 50 мкг/мл, доза циклоспорина А 0,1 мкг/мл).

По оси абсцисс — время от начала культивирования; по оси ординат — количество, имп/мл $\cdot 10^4$. 1, 3 — спонтанная пролиферация клеток; 2 — эффект циклоспорина А; 4 — подавляющий эффект VM-2-84.

культуры клеток и при усилении продукции IgG [10]. Однако нельзя исключить прямого стимулирующего влияния на Т-хелперы II типа, когда и в культуре клеток, и в организме животного будет возрастать количество ИЛ-4 и ИЛ-5 [9], что повлечет за собой усиление антителообразования *in vivo* и *in vitro* [14] и усиление ответа на ЛПС *in vitro*. На этом фоне выработка ИЛ-2 и γ -интерферона будет вторично подавлена, что вызовет ингибирование Т-клеточной пролиферации в ответ на антигены и митогены.

Выводы

1. АКК ингибируют спонтанную и индуцированную КонА пролиферацию тимоцитов и спленоцитов двух различных линий мышей при внесении их в культуру клеток в дозах 5—50 мкг/мл.
2. В СКЛ наибольшей способностью подавлять антигениндуцированную пролиферацию клеток обладал препарат VM-2-84.
3. В отличие от известного ингибитора Т-клеточного звена иммунной системы циклоспорина А, антипролиферативное действие которого проявляется лишь на ранних этапах клеточного цикла, производные АКК подавляют пролиферацию в различные сроки от начала культивирования.
4. Производные АКК стимулируют ЛПС-индуцированную В-клеточную пролиферацию спленоцитов мыши *in vitro* как в неразделенной культуре спленоцитов, так и в культуре, обогащенной В-клетками.
5. Препараты данной группы дозозависимо стимулируют синтез IgG *in vitro*.

ЛИТЕРАТУРА

1. Козлов В. А., Колесникова О. П., Кудаева О. Т. и др. // Международный симпозиум по аллергологии и иммунологии: Тезисы докладов. — Алма-Ата, 1992. — С. 162.
2. Колесникова О. П., Кудаева О. Т., Логинов В. А. и др. // Всесоюзный симпозиум с международным участием на тему: «Патогенез хронического воспаления»: Тезисы докладов. — Новосибирск, 1991. — С. 89.

3. *Bomono A. C. et al.*// Cell. Immunol.— 1990.— Vol. 125.— P. 210—224.
4. *Bellavia A., Micklem H. S.*// Transplantation.— 1977.— Vol. 23.— P. 290—292.
5. *Cher D.*// J. Immunol.— 1987.— Vol.138.— P. 3688.
6. *Clevenger Ch. V., Russel D. H.*// Proc. nat. Acad. Sci. USA.— 1990.— Vol. 87.— P. 6460—6464.
7. *Galevsky Th. F., Joyce J.*// J. Immunol.— 1989.— Vol. 143.— P. 15—22.
8. *Kimball P. M., Kerman R. II., Kahan B. D.*// Transplantation.— 1991.— Vol. 51.— P. 509—513.
9. *Mage M. G., McHugh L. L., Rothstein T. L.*// J. immunol. Meth.— 1977.— Vol. 15.— P. 47.
10. *Rasmussen R., Takatsu K.*// J. Immunol.— 1988.— Vol. 140, № 3.
11. *Renz H., Mazer B. D., Gelfand E. W.*// J. Immunol.— 1990.— Vol. 145.— P. 3641—3646.
12. *Rosenberg J. S., Gilman S. C., Feldman L. D.*// Ibid.— 1982.— Vol. 129.— P. 996.
13. *Stevenson J. R.*// Immonol. Invest.— 1989.— Vol. 18, № 8.— P. 951—960.
14. *Yasuyuki Takai, Wong G. G.*// J. Immunol.— 1988.— Vol. 140, № 2.

Поступила 28.09.93

O. P. Kolesnikova, O. T. Kudayeva, M. N. Tuzova, I. V. Safronova, A. N. Mirskova, G. G. Levkovskaya, V. A. Kozlov — ON THE MECHANISMS OF IMMUNOMODULATING EFFECT OF ALKANCARBONIC ACID DERIVATIVES

Immunotropic properties of new oxygen-sulfur-containing derivatives of alkancarbonic acids were revealed in various models of cellular immune response. Capacity to suppress the proliferative response to conA in mixed lymphocyte culture and to stimulate response to *E. coli* lipopolysaccharide, as well as to *in vitro* spontaneous synthesis of immunoglobulins was detected. The mechanism of T-lymphotropic inhibitory effect differs from that of ciclosporin A. Experiments were carried out with hybrid mice F1 (C57B1/6 × DBA/2).