

---

---

## РЕГУЛЯЦИЯ ИММУНИТЕТА

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 1995  
УДК 615.31.546.289].015.46.07

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

### **МЕХАНИЗМЫ ИММУНОМОДУЛИРУЮЩЕГО ЭФФЕКТА ГЕРМАНИЙОРГАНИЧЕСКИХ СОЕДИНЕНИЙ**

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

В связи с достижениями химического синтеза исследователи стали обращать внимание на металлоорганические соединения как на потенциальные лекарственные препараты. Многие металлы, особенно в качестве микроэлементов, способствуют нормальному созреванию и функционированию иммунокомпетентных клеток [4]. Активность микроэлементов в составе органических соединений больше, чем в неорганических солях [2]. Из группы германийсодержащих органических соединений (ГОС) наиболее изучены препараты  $^{132}\text{Ge}$  и спирогермания. В клинической практике эти вещества применялись как противоопухолевые средства. Множество публикаций свидетельствует как о прямом воздействии этих веществ на опухолевые клетки, так и об их

опосредованном влиянии на макрофаги и Т-лимфоциты [13—15]. Есть данные о стимулирующем влиянии  $^{132}\text{Ge}$  на антителогенез в селезенке мышей [13]. Однако полного представления о механизме действия ГОС на разные звенья иммунного ответа до сих пор не сложилось.

Мы изучали 3 новых вещества германийорганической природы, синтезированных в Иркутском институте органической химии СО РАН и относящихся к группе герматранов. Их химическая структура является предметом авторских свидетельств с запретом открытой публикации, поэтому в дальнейшем эти препараты обозначены как Гр-1, Гр-2 и Гр-3.

Целью настоящей работы было изучение воздействия этих веществ на Т- и В-клеточные звенья иммунной системы *in vivo* и на пролиферативную активность тимоцитов и спленоцитов мыши *in vitro*.

*Методика исследования.* В экспериментах *in vivo* использовали мышей-самок  $F_1$  (C57BL/6×DBA/2) в возрасте 8—12 нед, полученных из питомника "Столбовая".

Для исследования иммуностропных свойств герматранов мышам 2 групп вводили Гр-1 и Гр-3 в дозе 50 мг/кг троекратно внутривентриально с интервалом 24 ч. (Каждая группа содержала не менее 5 животных). Через 1 сут после последней инъекции препаратов взвешивали лимфоидные органы (тимус, селезенка и паховый лимфатический узел) и рассчитывали отношение

их массы к массе тела мыши в процентах. Контролем служила группа из 5 интактных животных того же возраста и пола, не получавших препарат.

Влияние препарата на выраженность реакции гиперчувствительности замедленного типа (ГЗТ) исследовали по стандартной методике локальной ГЗТ [8, 9]. Предварительно опытным группам мышей вводили растворы ГОС в дозе 50 мг/кг трехкратно внутрибрюшинно с интервалом 24 ч. В день последней инъекции вводили сенсибилизирующую дозу антигена (0,1% взвесь эритроцитов барана в питательной среде 199, ИПО "Вектор"), а на 4-е сутки — разрешающую дозу антигена (50 мкл 50% взвеси эритроцитов барана) под подошвенный апоневроз правой задней лапы. В контролateralную лапу вводили растворитель в том же объеме. Результат реакции учитывали через 24 часа по величине местного отека. Результаты выражали в процентах и сравнивали с таковыми у животных контрольной группы.

При изучении воздействия препаратов на кооперацию Т- и В-лимфоцитов *in vivo* использовали модель адоптивного переноса сингенных клеток. Донорам клеток делали инъекции раствора Гр-3 в дозе 50 мг/кг трехкратно внутрибрюшинно с интервалом 24 ч. Через 1 сут после последней инъекции донорские клетки костного мозга и тимуса трансплантировали летально облученным реципиентам [3]. Одновременно проводили иммунизацию реципиентов эритроцитами барана. Результаты оценивали на 8-е сутки методом локального гемолиза по количеству антителообразующих клеток.

В экспериментах *in vitro* использовали клетки мышей BALB/c, F<sub>1</sub>(C57BL/6×DBA/2) и F<sub>1</sub>(CBA×C57BL/6), полученных из питомника "Столбовая".

Спленоциты и тимоциты мышей получали в стерильных условиях [11]. Полученную клеточную суспензию доводили до концентрации 2×10<sup>6</sup> клеток/мл среды и помещали в 96-луночные планшеты для культивирования (Ленинград) по 2×10<sup>5</sup> клеток/луночка в среде RPMI-1640 (ИПО "Вектор"), содержащей 10% эмбриональной сыворотки телят, 10 мМ ПЕРЕС, 2×10<sup>-5</sup> М 2-меркаптоэтанол ("Sigma"), 2мМ L-глутамин (ИПО "Вектор"), 50 мкг/мл гентамицина. Оптимальная доза каннавалина А (КонА), оттитрованная в предварительных опытах, составила 10 мкг/мл среды для митогениндуцированной пролиферации клеток. Растворы ГОС вносили в лунки в конечных концентрациях 5, 50 и 250 мкг/мл среды как одновременно с КонА, так и через 24 и 48 ч от начала культивирования. Инкубацию клеточной культуры проводили в атмосфере с 5% СО<sub>2</sub> при 37°С в течение 72 ч.

В части опытов растворы герматранов вводили мышам *in vivo* в дозе 50 мг/кг внутрибрюшинно трехкратно с интервалом 48 ч. Через 1 сут после последней инъекции выделяли тимоциты и спленоциты этих мышей и тестировали описанным выше способом.

Влияние ГОС на антигенстимулированную пролиферацию изучали в смешанной культуре лимфоцитов (СКЛ) [5]. В качестве респондеров использовали спленоциты мышей BALB/6, в качестве стимуляторов пролиферации — спленоциты мышей СВА, облученные в дозе 2000 рад. Количество клеток в лунке и условия культивирования аналогичны описанным выше; отношение респондеров к стимуляторам было установлено в предварительных опытах и составило 2:1.

За 4 ч до конца инкубации во все лунки добавляли по 3,7×10<sup>4</sup> Бк (1 мКи) <sup>3</sup>H-тимидина. По окончании инкубации клетки собирали на фильтры с помощью аппарата "Харвест" ("Titertek"). Фильтры помещали во флаконы для сцинтилляционного счета, и радиоактивность подсчитывали в толуольном сцинтилляторе (4 г дифенилоксазола и 0,1 г дифенилоксазолбензола на 1 л толуола) в жидкостном сцинтилляционном счетчике («Delta»).

Результаты выражали в имп/мин включенного тимидина на 2×10<sup>5</sup> клеток. Данные оценивали как в абсолютных цифрах, так и с помощью индекса стимуляции (ИС) по формуле

$$ИС = \frac{\text{опыт(в имп/мин)}}{\text{контроль(в имп/мин)}}$$

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

Влияние герматранов на синтез IgG оценивали в супернатанте культуры мышинных спленоцитов, стимулированных липосахаридом (ЛПС) *Escherichia coli* штамма 055:B5 иммуноферментным методом. Спленоциты выделяли в стерильных условиях описанным выше способом [11]. Стимулирующая доза ЛПС, оттитрованная в предварительных опытах, составила 50 мкг/мл среды. Состав культуральной среды и условия культивирования аналогичны таковым в КонА-индуцированной культуре. Время культивирования 7 сут. На 7-е сутки клетки

осаждали центрифугированием при 3000 об/мин по 10 мин трехкратно, и супернатант тестировали на содержание IgG. Для тестирования заранее готовили микротитрационные платы ("Linbro", E.I.A.) — покрывали антителами к анализируемым иммуноглобулинам (антитела кролика к IgG мыши, БИОС, Новосибирск) в количестве 0,2 мл/луночка. Сенсибилизирующую концентрацию подбирали в предварительных опытах, она составила 2 мкг/мл. Планшет инкубировали 4 ч при комнатной температуре и в течение ночи при 4°С.

В день тестирования антитела удаляли сильным встряхиванием, планшет промывали фосфатным буферным раствором 3 раза и еще 3 раза дистиллированной водой. Затем лунки обрабатывали 0,1% раствором желатина в фосфатном буферном растворе и планшет инкубировали 1 ч при 37°С. По окончании инкубации лунки планшета промывали описанным выше способом, затем в него вносили стандартный раствор IgG и анализируемые образцы. Инкубацию проводили 2 ч при 37°С. Далее платы обрабатывали пероксидазным конъюгатом антител кролика к целой молекуле IgG мыши в разведении 1:50 и субстратом (ОФД в натрий-фосфатном буфере 0,15 М рН 5,0). Планшет инкубировали при 37°С в течение 1 ч, после чего промывали 0,05% раствором твин-20 в забуференном изотоническом растворе хлорида натрия. Фермент-субстратную реакцию останавливали добавлением 3 М раствора серной кислоты. Интенсивность реакции оценивали на приборе «Мультискан» («Titertek») при длине волны 492 нм. Количество IgG определяли по построенной для каждого планшета калибровочной кривой. Результаты выражали как в абсолютных значениях, так и с помощью ИС.

$$ИС = \frac{\text{ЛПС- стимулированный синтез IgG}}{\text{Спонтанный синтез IgG}}$$

Результаты и обсуждение. Исследование иммуностропных свойств герматранов *in vivo* позволило выявить выраженный Т-лимфотропный эффект, проявляющийся в достоверном снижении массы тимуса в опытных группах животных по сравнению с контрольными, не получавшими инъекций данных препаратов. Сравнительные данные представлены в табл. 1.

Т-лимфотропное действие подтверждается и подавлением герматранами реакции гиперчувствительности замедленного типа (ГЗТ) *in vivo*. Данные, представленные в табл. 2, свидетельствуют о достоверном ослаблении ГЗТ после введения препаратов.

Анализ результатов, полученных при исследовании кооперативных взаимодействий Т- и В-лимфоцитов *in vivo* по влиянием данной группы ГОС, позволяет предполагать, что наряду с подавлением функции Т-лимфоцитов происходит стимуляция В-звена иммунитета (табл. 3).

Разнонаправленность влияния ГОС на Т- и В-клеточные звенья иммунной системы потребовала дальнейших исследований *in vitro*.

Изучение влияния герматранов на процессы в культуре *in vitro* было начато с исключения прямого токсического воздействия на живые клетки (по включению трипанового синего). Внесение препаратов в концентрациях от 5 до 50 мкг/мл не оказывало существенного влияния на жизнеспособность клеток (количество живых клеток

Таблица 1

Влияние герматранов на массу иммунных органов *in vivo*

Группа животных	% массы тела мыши		
	тимус	селезенка	паховый лимфатический узел
Контрольная	0,36	0,53	0,02
1-я	0,14*	0,50	0,02
2-я	0,17*	0,42	0,017

\*Здесь и в табл. 2  $p < 0,05$ .

Таблица 2

Влияние герматранов на выраженность ГЗТ

Группа животных	Выраженность ГЗТ, %
Контрольная	47
1-я	21*
2-я	28*
3-я	27*

Таблица 3

Влияние герматранов на кооперацию Т- и В-лимфоцитов in vivo

Группа реципиентов	Количество АОК на селезенку
Контроль. Т- и В-лимфоциты интактных доноров	1143 ± 127
1-я. В-лимфоциты интактных доноров, Т-лимфоциты доноров, получавших Гр-3	566 ± 62
2-я. Т- и В-лимфоциты доноров, получавших Гр-3	487 ± 58
3-я. Т-лимфоциты интактных доноров, В-лимфоциты доноров, получавших Гр-3	2091 ± 124

87—95% исходного). Следовательно, Т-лимфотропное ингибирующее действие не связано с гибелью Т-лимфоцитов.

При изучении воздействия данного вида соединений на спонтанную пролиферацию спленоцитов и тимоцитов установлено, что этот показатель снижается на 25%. При добавлении оптимальной дозы КонА, оттитрованной в предварительных опытах и составившей 10 мкг/мл, к культуре спленоцитов подавление митогенстимулированной пролиферации было дозозависимым (рис. 1). Как видно из рис. 2, ингибирующий эффект сохранялся независимо от видовой и органной принадлежности иммунокомпетентных клеток. Препараты Гр-1 и Гр-3 подавляли митогениндуцированную пролиферацию спленоцитов мышей  $F_1$ (СВА×С57ВЛ/6) на 50 и 75% соответственно, в то время как пролиферацию спленоцитов мышей  $F_1$ (С57ВЛ/6×ДВА/2) — лишь на 16% (см. рис. 2). При использовании тимоцитов мышей  $F_1$ (С57ВЛ/6×ДВА/2) подавление составило 55% исходной пролиферации тимоцитов гибридов  $F_1$  данного генотипа (см. рис. 2).

При исследовании пролиферативной способности тимоцитов и спленоцитов мышей  $F_1$ (С57ВЛ/6×ДВА/2) после введения герматранов

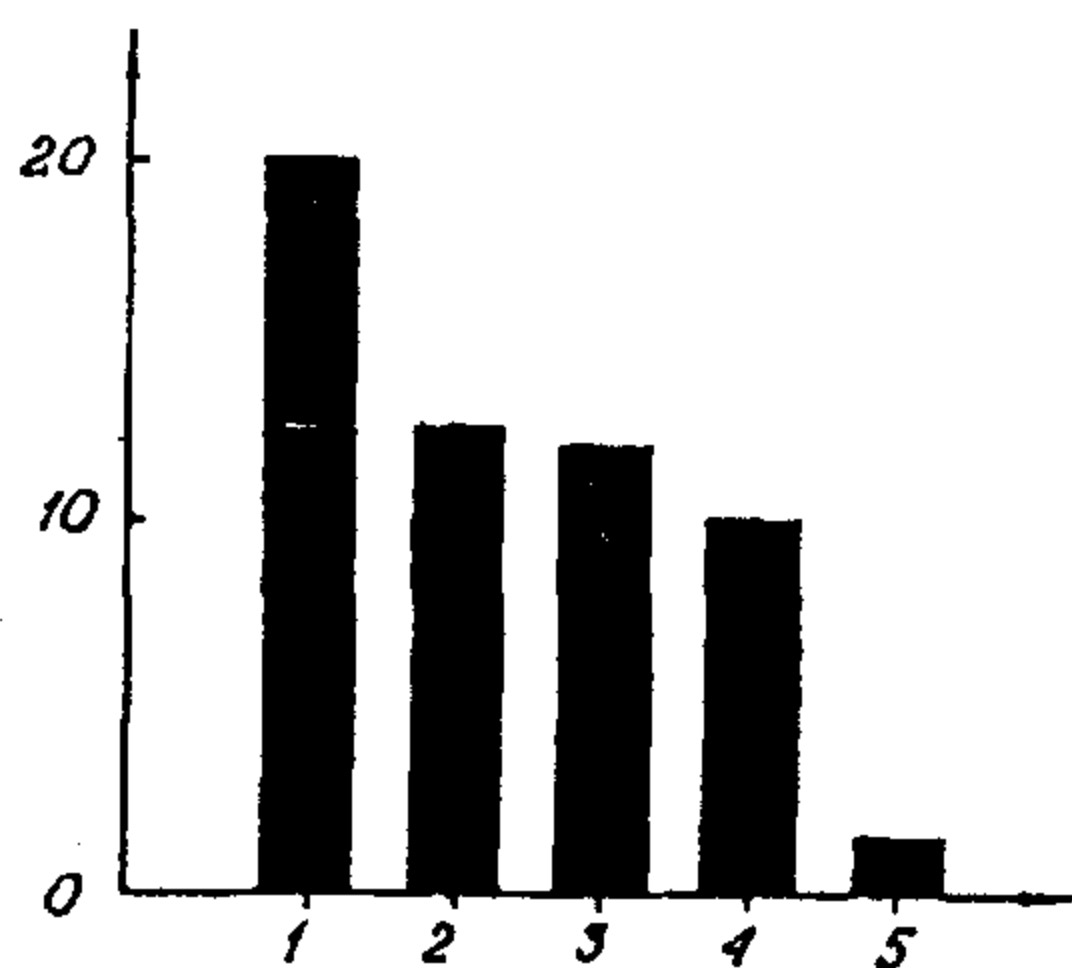


Рис. 1. Подавление пролиферации спленоцитов мышей  $F_1$ (С57ВЛ/6×ДВА/2) под влиянием Гр-1 и Гр-3 при использовании оптимальной дозы КонА.

По оси абсцисс: 1 — исходный уровень пролиферации; 2 — при добавлении Гр-1 в дозе 5 мкг/мл; 3 — при добавлении Гр-1 в дозе 50 мкг/мл; 4 — при добавлении Гр-3 в дозе 5 мкг/мл; 5 — при добавлении Гр-3 в дозе 50 мкг/мл; по оси ординат — имп/мин × 10<sup>-4</sup>.

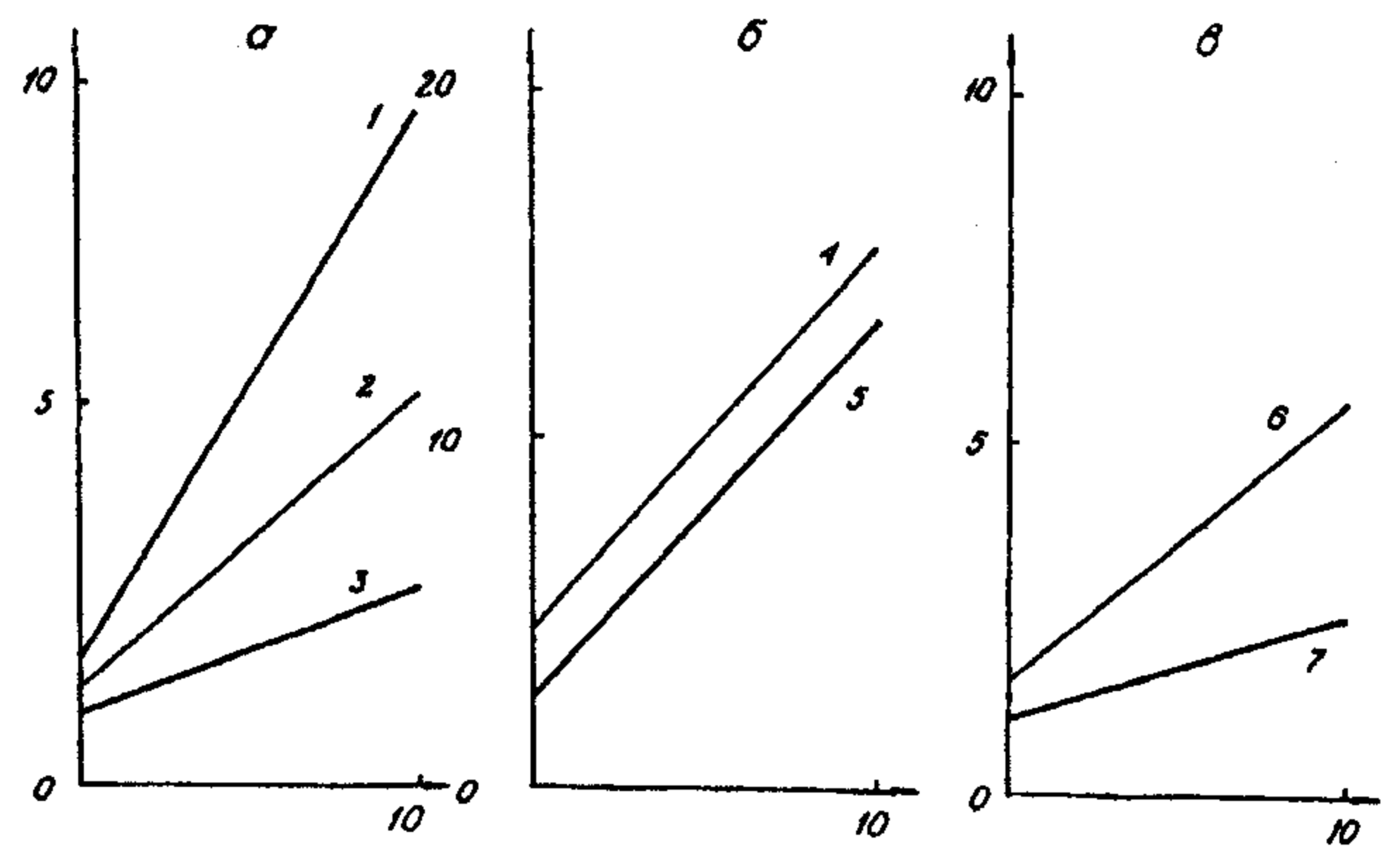


Рис. 2. Подавление пролиферации тимоцитов и спленоцитов мышей-гибридов  $F_1$  разных генотипов под влиянием герматранов при использовании оптимальной дозы КонА.

По оси абсцисс — доза КонА (10 мкг/мл), по оси ординат — имп/мин × 10<sup>-4</sup>. а — подавление пролиферации спленоцитов мышей  $F_1$ (СВА × С57ВЛ/6): 1 — исходный уровень пролиферации; 2 — при добавлении Гр-1 в дозе 50 мкг/мл; 3 — при добавлении Гр-3 в дозе 50 мкг/мл; б — подавление пролиферации спленоцитов мышей  $F_1$ (С57ВЛ/6 × ДВА/2); 4 — исходный уровень пролиферации; 5 — при добавлении Гр-3 в дозе 50 мкг/мл; в — подавление пролиферации тимоцитов мышей  $F_1$ (С57ВЛ/6 × ДВА/2); 6 — исходный уровень пролиферации; 7 — при добавлении Гр-3 в дозе 50 мкг/мл.

in vivo мы наблюдали ингибицию соответственно на 55 и 65% исходной (рис. 3, а, б).

На рис. 4 представлены данные, позволяющие говорить об ингибирующем влиянии герматранов на антигениндуцированную пролиферацию в СКЛ. По сравнению с исходным уровнем СКЛ внесение в культуру герматранов подавляло выраженность реакции на 49% для Гр-1 и на 54% для Гр-3.

Внесение вещества Гр-3 в культуру клеток в различные сроки от начала митогенеза (одновременно с митогеном, через 24 и 48 ч от начала культивирования) выявило различия в механизме его воздействия на пролиферирующие клетки со

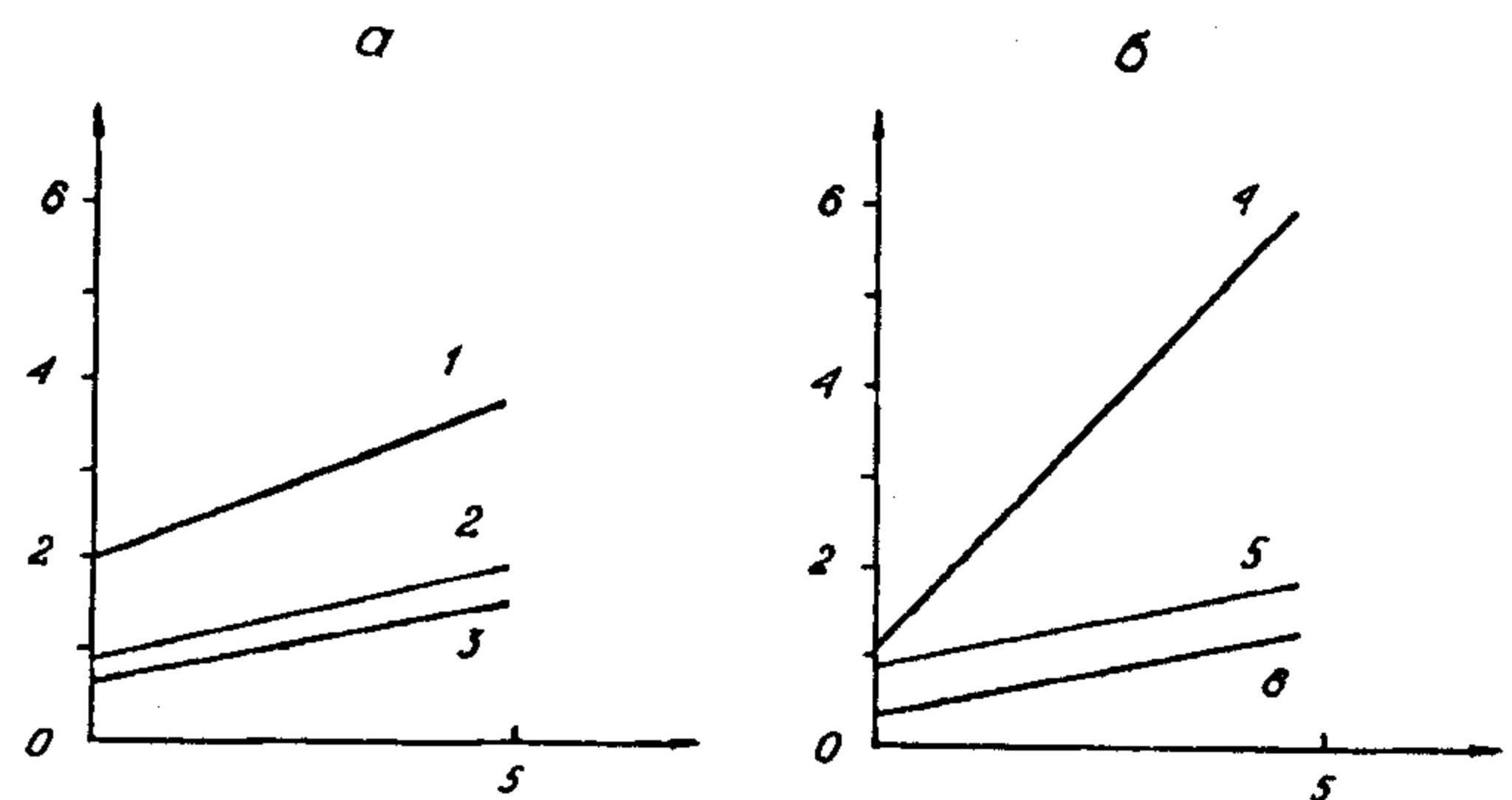


Рис. 3. Подавление пролиферации тимоцитов и спленоцитов мышей  $F_1$ (С57ВЛ/6×ДВА/2) после введения Гр-1 и Гр-3 внутривенно в дозе 50 мг/кг.

По оси ординат — имп/мин × 10<sup>-4</sup>, по оси абсцисс — доза КонА. а — подавление пролиферации тимоцитов: 1 — исходный уровень пролиферации, 2 — после введения Гр-1, 3 — после введения Гр-3; б — подавление пролиферации спленоцитов: 4 — исходный уровень пролиферации; 5 — после введения Гр-3; 6 — после введения Гр-1.

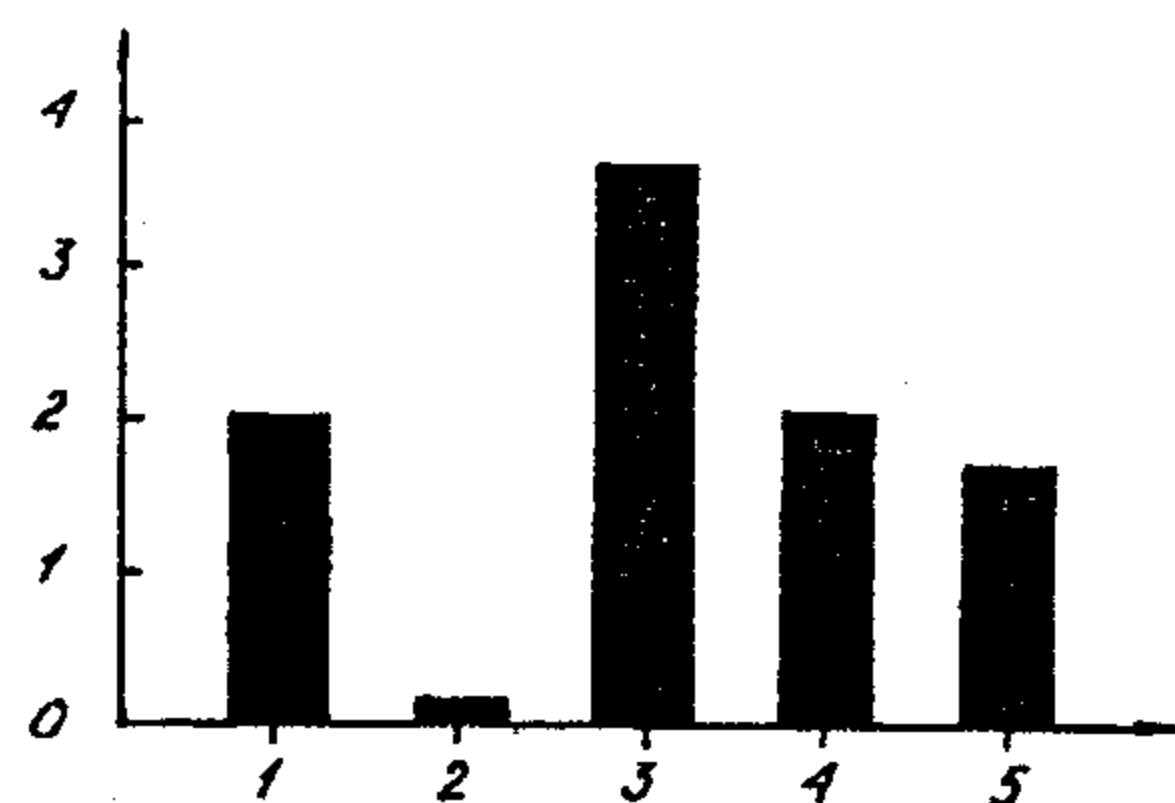


Рис. 4. Подавление герматранами в дозе 50 мкг/мл антигениндуцированной пролиферации спленоцитов в СКЛ.

По оси абсцисс: 1 — пролиферация клеток-респондеров; 2 — пролиферация клеток-стимуляторов; 3 — исходный уровень СКЛ; 4 — подавление пролиферации Гр-1; 5 — подавление пролиферации Гр-3; по оси ординат — имп/мин × 10<sup>-4</sup>.

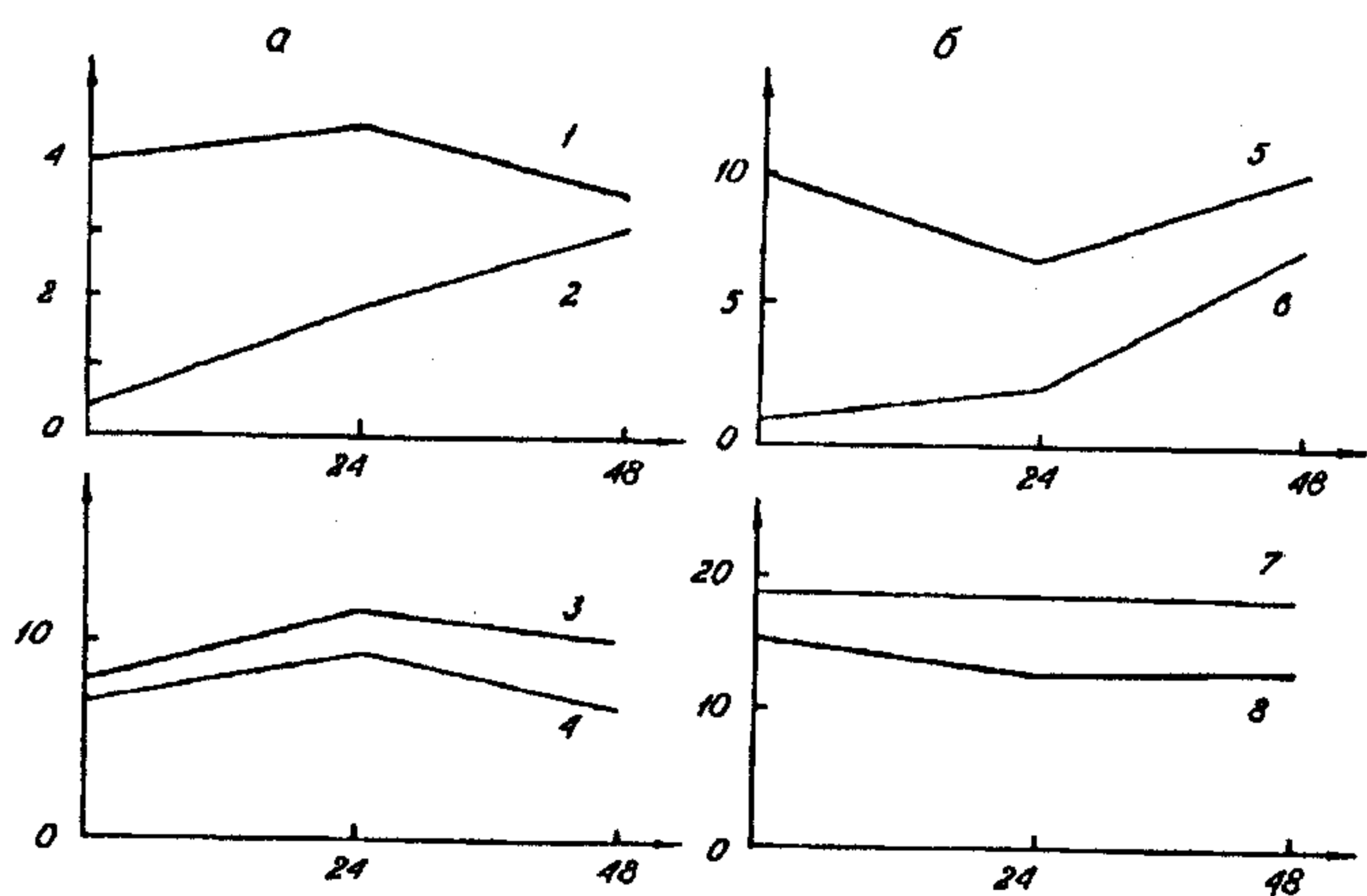


Рис. 5. Подавление спонтанной и КонА-индуцированной пролиферации под влиянием герматранов, внесенных в различные сроки от начала культивирования, в сравнении с циклоспорином А (доза КонА 10 мкг/мл, доза герматранов 50 мкг/мл, доза циклоспоринона А 0,1 мкг/мл).

По оси абсцисс — время от начала культивирования, ч; по оси ординат — имп/мин  $\times 10^{-4}$ . а — подавление спонтанной пролиферации спленоцитов мышей  $F_1(C57BL/6 \times DBA/2)$  в сравнении с циклоспорином А: 1 — исходный уровень спонтанной пролиферации; 2 — подавляющий эффект циклоспоринона А; 3 — исходный уровень спонтанной пролиферации; 4 — подавляющий эффект Гр-3; б — подавление герматранами митогениндуцированной пролиферации спленоцитов мышей  $F_1(C57BL/6 \times DBA/2)$  в сравнении с циклоспорином А: 5 — исходный уровень КонА-индуцированной пролиферации; 6 — подавляющий эффект циклоспоринона А; 7 — исходный уровень КонА-индуцированной пролиферации; 8 — подавляющий эффект Гр-3.

стандартным ингибитором Т-клеточной пролиферации — циклоспорином А [10]. Механизм действия циклоспоринона А связан с подавлением продукции интерлейкина-2 (ИЛ-2) на ранних стадиях Т-клеточной активации. Как видно из рис. 5, в отличие от циклоспоринона А, действие которого проявляется только в ранние стадии митогенного цикла, Гр-3 подавляет спонтанную и митогениндуцированную пролиферацию спленоцитов не только при внесении его в культуру в 0 ч. Напротив, через 48 ч его эффект возрастает, тогда как у циклоспоринона А стремится к исходному уровню. Воздействие ГОС на пролиферирующие клетки значительно уступает таковому циклоспоринона А. Это говорит о других механизмах Т-лимфотропного действия, отличных от механизмов циклоспоринона А.

Данные, представленные на рис. 6, позволяют судить о влиянии герматрана Гр-3 на спонтанный и ЛПС-стимулированный синтез IgG in vitro. В дозе 50 мкг/мл этот препарат достоверно повышает спонтанный синтез IgG, практически не влияя на ЛПС-стимулированный.

Описанные выше эффекты позволяют предположительно судить о механизме действия герматранов на иммунокомпетентные клетки. Наиболее вероятным представляется прямое стимулирующее воздействие на Т-хелперы 2-го типа, когда и в культуре клеток, и в организме животного возрастает количество ИЛ-4 и ИЛ-5 [6], что влечет за собой усиление антителообразования in vivo [20] и повышение спонтанного синтеза IgG in vitro. На этом фоне идет вторичное подавление выработки ИЛ-2 Т-хелперами 1-го типа, что вызывает угнетение Т-клеточной пролиферации в ответ на митогены и антигены, но в другие сроки и не такое интенсивное, как у циклоспоринона А [7]. Сохранение ингибирующего эффекта через 24—48 ч от начала культивирования также свидетельствует в пользу выработки ИЛ-4, так как совпадает по времени с его накоплением в

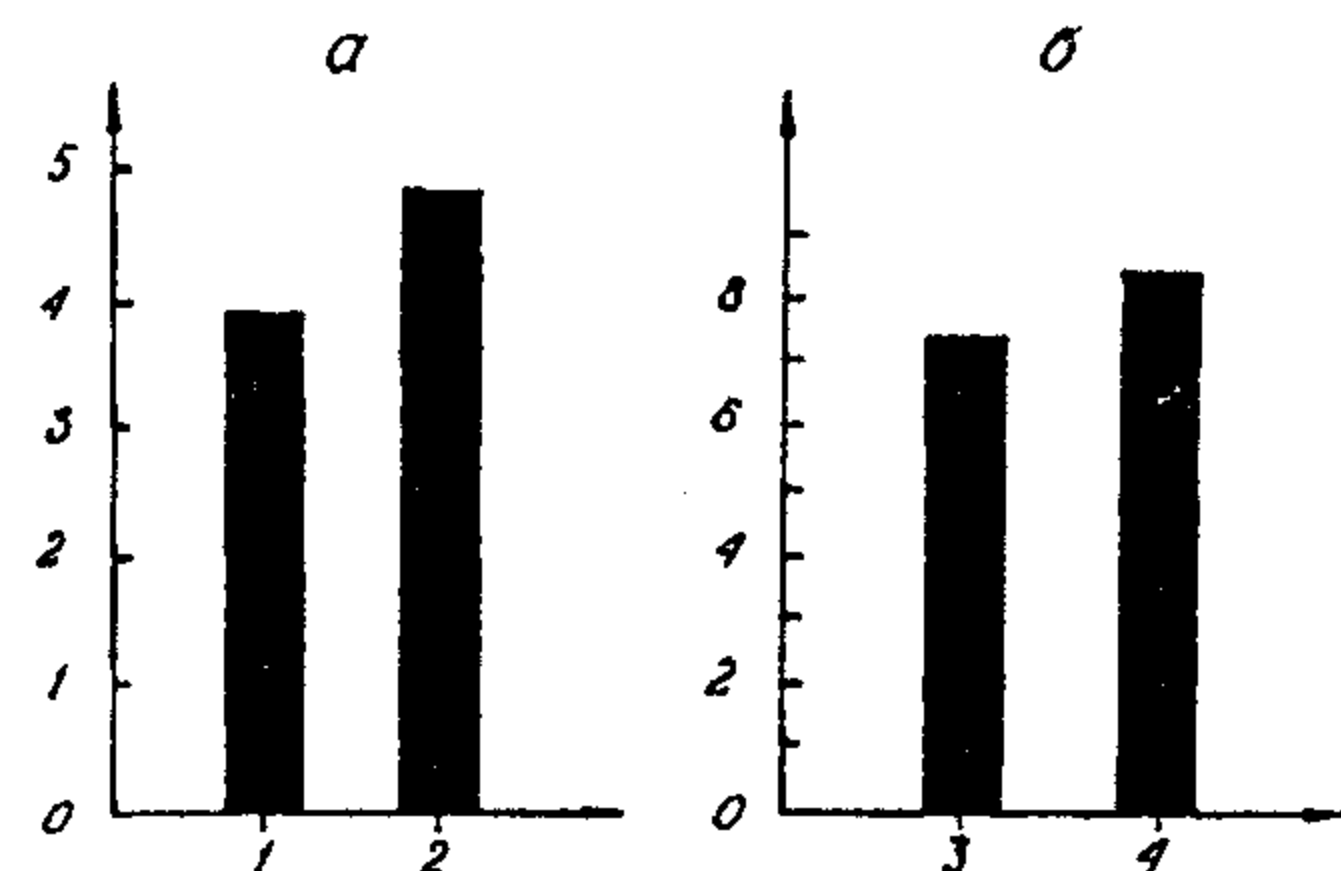


Рис. 6. Стимулирующее влияние на спонтанный синтез IgG in vitro препарата Гр-3.

По оси абсцисс — абсолютное количество IgG, мкг/мл; по оси ординат: а — спонтанный синтез IgG; 1 — исходный уровень; 2 — стимулирующий эффект Гр-3; б — ЛПС-стимулированный синтез IgG; 3 — исходный уровень ответа на ЛПС; 4 — влияние Гр-3 на ЛПС-стимулированный синтез IgG.

культуре делящихся клеток [1]. В предложенную схему иммуномодулирующего действия герматранов хорошо вписываются данные о влиянии препаратов in vivo.

## Выводы

1. Герматраны проявляют выраженное Т-лимфотропное действие in vivo.
2. Герматраны достоверно снижают выраженность ГЗТ in vivo.
3. При кооперации Т- и В-лимфоцитов in vivo Т-лимфотропное ингибирующее действие сочетается с В-лимфотропным стимулирующим.
4. Герматраны ингибируют спонтанную и КонА-индуцированную пролиферацию тимоцитов и спленоцитов гибридов  $F_1$  2 различных генотипов при внесении их в культуру в дозах 5—50 мкг/мл.
5. ГОС, особенно Гр-3, способны подавлять антигениндуцированную пролиферацию в СКЛ.
6. Подавляющее воздействие данной группы веществ на культуру делящихся клеток отличается от такового циклоспоринона А.
7. После введения препаратов in vivo подавляющее воздействие на КонА-индуцированную пролиферацию иммунокомпетентных клеток сохраняется.
8. Вещество Гр-3 стимулирует спонтанный синтез IgG in vitro, не влияя на ЛПС-стимулированный синтез.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Кетлинский С.А., Симбирцев А.С., Воробьев А.А. Эндогенные иммуномодуляторы. — СПб., 1992.
2. Лазарева Д.Н., Алехин Е.К. Стимуляторы иммунитета. — М., 1985.
3. Методические материалы по экспериментальному (фармакологическому) и клиническому испытанию действия фармакологических средств. — М., 1984.
4. Beisel W.R. // Amer. J. clin. Nutr. — 1982. — Vol. 35. — P. 417—468.
5. Bonomo A.C. et al. // Cell. Immunol. — 1990. — Vol. 125. — P. 210—224.
6. Cher D. // J. Immunol. — 1987. — Vol. 138. — P. 3688.
7. Clevenger Ch.W., Russel D.H. // Proc. nat. Acad. Sci. USA. — 1990. — Vol. 87. — P. 6460—6464.
8. Crowle A.J. // Advanc. Immunol. — 1975. — Vol. 20. — P. 197—264.
9. Heeinecke H., Zschiesche W. // Zwierzeta Lab. — 1975. — Vol. 12. — P. 1—19.
10. Kimball P.M., Kerman R.H., Kahan B.D. // Transplantation. — 1991. — Vol. 51. — P. 509—513.
11. Mage M.G., McHugh U., Rothstein T.L. // J. Immunol. Meth. — 1977. — Vol. 15. — P. 47.

12. Rasmussen R., Takatsu K. // J. Immunol. — 1988. — Vol. 140. — P. 30—31.
13. Shoji Y., Nizushima Y., Kametani T. // J. pharm. Soc. Jap. — 1986. — Vol. 106. — P. 609—614.
14. Suzuki F., Brutkiewicz R.R., Pollard R.B. // Anticancer Res. — 1985. — Vol. 5. — P. 479—483.
15. Suzuki F., Brutkiewicz R.R., Pollard R.B. // Ibid. — 1986. — Vol. 6. — P. 177—182.

Поступила 28.09.93

ORGANOGERMANIC COMPOUNDS: MECHANISMS OF IMMUNOMODULATING EFFECTS. — *O.P. Kolesnikova, M.N. Tuzova, O.T. Kudaeva, I.V. Safronova, A.N. Mirskova, V.P. Baryshok, V.A.Kozlov*

The study of germatrane effects vs those of cyclosporin A on in vivo and in vitro function of immunocompetent cells was carried out on hybrid mice F<sub>1</sub>(C57B1/6xDBA/2). These compounds were found able to stimulate immune response in vivo and spontaneous IgG synthesis in vitro, to enhance cooperative B cell response in vivo. In vitro proliferative response to T-cell mitogen and to allogenic lymphocytes in mixed culture was inhibited.