

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 1996

УДК 616.611-002-092:612.017.1]-085.37-092.9

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

ИЗУЧЕНИЕ ЭФФЕКТА ПРОИЗВОДНЫХ ИНДОЛИЛ-3-АЦЕТАТА И ГЕРМАНИЙ-ОРГАНИЧЕСКИХ СОЕДИНЕНИЙ НА МОДЕЛИ АУТОИММУННОГО ГЛОМЕРУЛОНЕФРИТА, ИНДУЦИРОВАННОГО ХРОНИЧЕСКОЙ РЕАКЦИЕЙ ТРАНСПЛАНТАТ ПРОТИВ ХОЗЯИНА

Институт клинической иммунологии СО РАМН, Новосибирск

В задачу настоящего исследования входило определение возможных механизмов действия двух новых потенциальных иммуномодуляторов, относящихся к различным химическим группам и синтезированных Иркутским институтом органической химии СО РАН. Одно вещество является серо-азотопроизводным индолил-3-ацетата (ИЗА), а второе относится к группе герматранов (веществ германий-органической природы). ИЗА, на основе которого синтезировано первое вещество, является хорошо известным эндогенным растительным ауксином. Изучено его стимулирующее воздействие на вегетацию растений, однако на основе данного фитогормона синтезирован всего один лекарственный препарат — этодолак, нашедший широкое применение в клинике ревматических болезней. В частности, известны терапевтические и иммуностропные свойства этодолака как активного противовоспалительного препарата при лечении ревматоидного артрита [8]. Считается, что его эффект опосредован нормализацией функции Т-супрессоров и изменениями внутриклеточного метаболизма, в частности ингибированием синтеза лейкотриенов в липоксигеназном цикле окисления арахидоновой кислоты. Но в целом механизм действия ИЗА на иммунокомпетентные клетки не изучен и требует дальнейших исследований [9].

Другое вещество, представляющее интерес благодаря своим разнообразным биологическим свойствам, относится к группе германий-органических соединений (ГОС). Известно, что включение атомов неорганического соединения в молекулу органического вещества приводит к качественному изменению, иногда коренному, свойств как металла, так и органической основы. Подобный синтез позволяет получать вещества с совершенно новыми характеристиками, требующими тщательного изучения [5]. И действительно, ГОС дают эффекты, не характерные для соединений германия неорганической природы. В

частности, полностью теряется токсический эффект и приобретает способность вызывать регенерацию компонентов соединительной ткани [7]. Кроме того, выявляются противовирусная активность и противоопухолевое действие, связанное, возможно, с индукцией эндогенного γ -интерферона [6].

Изложенное выше побудило нас изучить иммуотропный эффект данных препаратов на адекватных моделях *in vivo* и *in vitro*.

Методика исследований. В экспериментах использовали мышей-самок (C57Bl/6 \times DBA/2) F_1 в возрасте 6–7 мес, полученных из питомника "Столбовая". У части мышей вызывали гломерулонефрит (ГН) в результате хронической реакции трансплантат против хозяина (РТПХ-индуцированный ГН), проявляющийся на 5-м месяце РТПХ. РТПХ индуцировали у мышей-гибридов (C57Bl/6 \times DBA/2) F_1 введением лимфоцитов родительской линии DBA/2 путем внутривенной инъекции $50 \cdot 10^6$ клеток в объеме 0,5 мл каждому реципиенту. Соотношение клеток лимфатических узлов, тимуса и селезенки в суспензии составляло 1:3:6 [4]. Наличие нефрита тестировали по уровню протеинурии *in vivo*. Диагностически значимым считали уровень не менее 3 г/л, что коррелировало с морфологическими изменениями почек [4]. Началом заболевания считали момент индукции РТПХ. В качестве контроля использовали интактных животных того же пола и возраста.

Спленоциты и тимоциты мышей получали в стерильных условиях [3]. Полученную клеточную суспензию доводили до концентрации $2 \cdot 10^6$ клеток в 1 мл среды и помещали в 96-луночные планшеты для культивирования (Санкт-Петербург) по $2 \cdot 10^5$ на лунку в среде RPMI 1640 (НПО "Вектор"), содержащей 10% эмбриональной сыворотки телят, 10 мМ НЕРЕС ("Sigma"), $4 \cdot 10^{-5}$ М 2-меркаптоэтанол ("Sigma"), 2 мМ L-глутамин (НПО "Вектор"), 50 мкг/мл гентамицина. Дозы конканавалина А (КонаА) и липополисахарида (ЛПС) *E. coli* 055:B5 ("Sigma") для пролиферации и дифференцировки клеток были оттитрованы заранее и составили для КонаА 5, 10 и 25 мкг/мл, для ЛПС 25, 50 и 100 мкг/мл. Доза ЛПС для индукции дифференцировки клеток составила 50 мкг/мл.

Растворы ИЗА и ГОС вносили в лунку в конечной концентрации 50 мкг на 1 мл среды одновременно с митогеном. Инкубацию клеточной культуры проводили в атмосфере 5% CO_2 и 95% воздуха при температуре 37°C в течение 72 ч с КонаА, 48 ч с ЛПС и 7 сут для последующего определения синтеза IgG *in vitro*.

За 4 ч до конца инкубации во все лунки добавляли по $3,7 \cdot 10^5$ Бк (1 мКи) 3H -тимидина. По окончании инкубации клетки собирали на фильтры с помощью аппарата "Харвестер" ("Titertek"). Фильтры помещали во флаконы для сцинтилляционного счета, радиоактивность подсчитывали в толуольном сцинтилляторе (4 г дифенилоксазола и 0,1 г дифенилоксазолилбензола на 1 л толуола) в жидкостном сцинтилляционном счетчике ("Delta"). Включение тимидина выражали в импульсах в 1 мин. Оценку полученных данных проводили с помощью абсолютных цифр непараметрическим методом Вилкоксона — Манна — Уитни. Контролем служила клеточная культура, инкубированная в отсутствие изучаемых соединений.

Влияние производного ИЗА и ГОС на дифференцировку клеток оценивали по синтезу IgG в супернатанте 7-суточной культуры мышечных спленоцитов иммуноферментным методом. Культивирование клеток осуществляли описанным выше способом. На 7-е сутки клетки осаждали центрифугированием при 3000 об/мин по 10 мин 3-кратно. Супернатант тестировали на содержание IgG. Для этого заранее готовили микротитрационные платы ("Linbro"), покрывали их антителами к анализируемым иммуноглобулинам — антителами кролика к IgG мыши (БИОС, Новосибирск) в количестве 0,2 мл на лунку. Сенсибилизирующую концентрацию подбирали в предварительных опытах, она составила 2 мкг/мл. Планшеты инкубировали 4 ч при комнатной температуре и в течение ночи при 4°C.

В день тестирования антитела удаляли сильным встряхиванием, планшеты промывали 3 раза фосфатным буферным раствором и еще 3 раза дистиллированной водой. Затем лунки обрабатывали 0,1% раствором желатина в фосфатном буферном растворе и планшет инкубировали 1 ч при 37°C. По окончании инкубации лунки планшета промывали описанным выше способом, туда вносили стандартный раствор IgG

и анализируемые образцы. Инкубацию проводили при 37°C в течение 2 ч. Далее платы обрабатывали пероксидазным конъюгатом антител кролика к целой молекуле IgG мыши в разведении 1:50 и субстратом (ОФД в 0,15 М натрий-фосфатном буфере pH 5,0). Инкубацию планшета осуществляли при 37°C в течение 1 ч, после чего планшет промывали 0,05% раствором твина-20 в забуференном растворе хлорида натрия. Фермент-субстратную реакцию останавливали добавлением 3 М раствора серной кислоты. Интенсивность реакции оценивали на приборе "Multiscan" ("Titertek") со светофильтром на 492 нм. Количественный подсчет IgG проводили по построенной для каждого планшета калибровочной кривой. Результаты оценивали в абсолютных цифрах непараметрическим методом Вилкоксона — Манна — Уитни.

Результаты и обсуждение. При изучении возможного механизма действия препаратов мы исходили как из особенностей иммуногенеза РТПХ-индуцированного ГН, так и из особенностей активации различных субпопуляций клеток под влиянием различных доз митогена. В частности, угнетение пролиферации под влиянием высоких доз КонаА связано с индукцией супрессоров, спонтанная пролиферация отражает в основном эндогенно активированные клетки *in vivo*, а ответ на оптимальную и субоптимальную дозы КонаА — функциональное состояние всех субпопуляций Т-хелперов [1]. В ЛПС-стимулированных культурах изучали влияние препаратов как на пролиферацию, так и на дифференцировку клеток (по синтезу IgG *in vitro*).

Известно, что РТПХ-индуцированный ГН имеет много общих черт в иммунопатогенезе с системной красной волчанкой (СКВ) у человека. Так, при СКВ снижается количество и угнетается активность Т-супрессоров, наблюдается дефицит Т-хелперов, хелперных факторов, угнетается ответ на митогены в культуре клеток. Изменяется и взаимодействие цитокинов с их рецепторами, например интерлейкин-2 (ИЛ-2) имеет несколько механизмов индукции аутоагрессивных процессов, непосредственно активируя цитотоксические Т-лимфоциты и(или) В-клетки. Поликлональная В-клеточная активация также может быть разделена на две стадии: индукцию и пролиферацию с экспрессией эффекторных функций. Ответ на митогены у В-клеток снижен, имеется дефект переключения синтеза IgM на IgG. Однако центральная роль в иммуногенезе СКВ принадлежит Т-хелперам II типа. В конечном счете все иммунологические повреждения ведут к В-клеточной гиперактивации, параллельно страдает Т-клеточная функция, причем Т-супрессорная функция отсутствует. При изучении природы антител к ДНК были выявлены IgG 2a и IgG 2b как доминирующие изотипы антител, способных повреждать базальные мембраны клубочков [1, 2].

При РТПХ-индуцированном ГН ведущая роль в патогенезе также принадлежит Т-хелперам II типа, что ведет к избыточной В-клеточной пролиферации, синтезу аутоантител, преимущественно IgG [2]. В то же время есть данные, свидетельствующие о том, что синтез IgG повышается лишь в первые 2–3 нед заболевания, а затем IgG фиксируются в органах-мишенях, образуя иммунные комплексы с собственными тканями организма и с гликопротеидом-70 эндогенных ретровирусов, которые в дальнейшем сами играют роль поликлональных активаторов В-клеток [2]. Описаны клоны активированных В-клеток, син-



Рис. 1

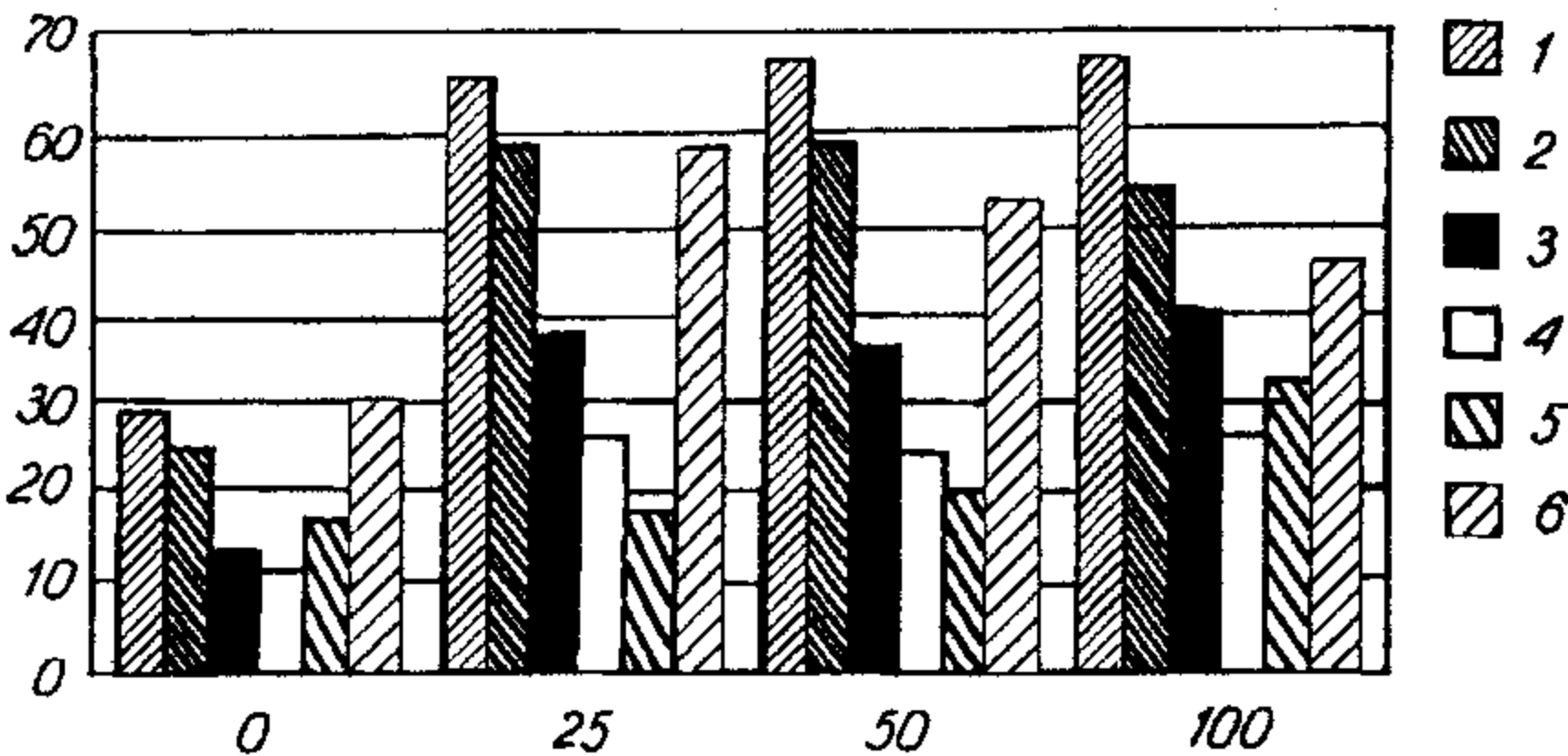


Рис. 2

Рис. 1. Влияние исследованных препаратов на спонтанный (1) и ЛПС-стимулированный (2) синтез IgG клетками селезенки.

По оси ординат — концентрация IgG в супернатанте (в мкг/мл). I — клетки интактных животных (контроль); II — изменение синтеза IgG клетками интактных животных под влиянием производного ИЗА; III — изменение синтеза IgG клетками интактных животных под влиянием ГОС; IV — синтез IgG клетками мышей с РТПХ-индуцированным ГН (контроль); V — изменение синтеза IgG клетками больных мышей под влиянием ИЗА; VI — изменение синтеза IgG клетками больных мышей под влиянием ГОС. Темные столбики — спонтанный синтез; светлые — ЛПС-стимулированный синтез IgG.

Рис. 2. Влияние препаратов на спонтанную и ЛПС-стимулированную пролиферацию клеток селезенки.

По оси абсцисс — доза ЛПС (в мкг/мл); по оси ординат — включение ^3H -тимидина (в имп/мин $\cdot 10^{-3}$). I — пролиферация клеток интактных животных (контроль); 2 — изменение пролиферации клеток интактных животных под влиянием производного ИЗА; 3 — изменение пролиферации клеток интактных животных под влиянием ГОС; 4 — пролиферация клеток мышей с РТПХ-индуцированным ГН; 5 — изменение пролиферации клеток больных животных под влиянием производного ИЗА; 6 — изменение пролиферации клеток больных животных под влиянием ГОС.

тезирующих растворимый рецептор к ИЛ-2 и несущих на мембране маркер Ly-1^+ . Именно эти клоны продуцируют аутоантитела, связывая большое количество ИЛ-2, что ведет к подавлению Т-клеточной пролиферации при нормальной продукции этого цитокина. Количество Т-супрессоров у таких мышей нормальное, их накопление происходит в селезенке реципиентов (фенотип Lyt-1^+), хотя их функция может страдать из-за связывания с Т-супрессорами родительской линии DBA/2 [1, 2].

На рис. 1 представлены собственные данные изучения синтеза IgG спленоцитами на 5-м месяце болезни. По сравнению с контролем он исходно подавлен, препараты обеих групп стимулируют его, но уровня IgG у здоровых мышей ЛПС-стимулированный синтез так и не достигает. Эффект может быть ассоциирован с лечебным действием вследствие стимуляции антиидиотипических антител.

На ЛПС-стимулированную пролиферацию клеток препараты влияют по-разному (рис. 2): спонтанная пролиферация повышается до нормального уровня лишь при действии ГОС, причем максимальная стимуляция достигается при минимальной дозе ЛПС, и наоборот. Производное ИЗА при минимальной дозе ЛПС вызывает

достоверный подавляющий эффект, а при других дозах не оказывает влияния. Это свидетельствует об участии в пролиферации и дифференцировке различных В-клеточных клонов, а различия в действии препаратов на интактных и больных мышей указывают на наличие патологических клеточных субпопуляций, не характерных для интактных животных.

Известно, что в селезенке нормальных мышей содержатся субпопуляции Т-клеток Thy-1^+ , Lyt-1^- , L3T4^- , которые хорошо активируются КоНА, после чего дифференцируются в лимфоциты Thy-1^+ , Lyt-1^+ , Lyt-2^- , L3T4^+ . При РТПХ-индуцированном ГН в селезенке накапливаются клетки Lyt-2^+ и L3T4^+ , причем первые преобладают [1, 2]. Таким образом, в норме и при патологии на стимуляцию КоНА отвечают клетки разных фенотипов и, следовательно, влияние препаратов на них тоже может быть различным.

На рис. 3 видно, что влияние ГОС направлено на эндогенно активированные клетки и на активность супрессоров, причем в норме активность Т-супрессоров усиливается, при патологии же она ослабляется, а пролиферация возрастает. Пролиферативный ответ клеток при оптимальной и субоптимальной дозах митогена находится под влиянием производного ИЗА, причем у интактных мышей он достоверно подавляется, а у больных достоверно возрастает.

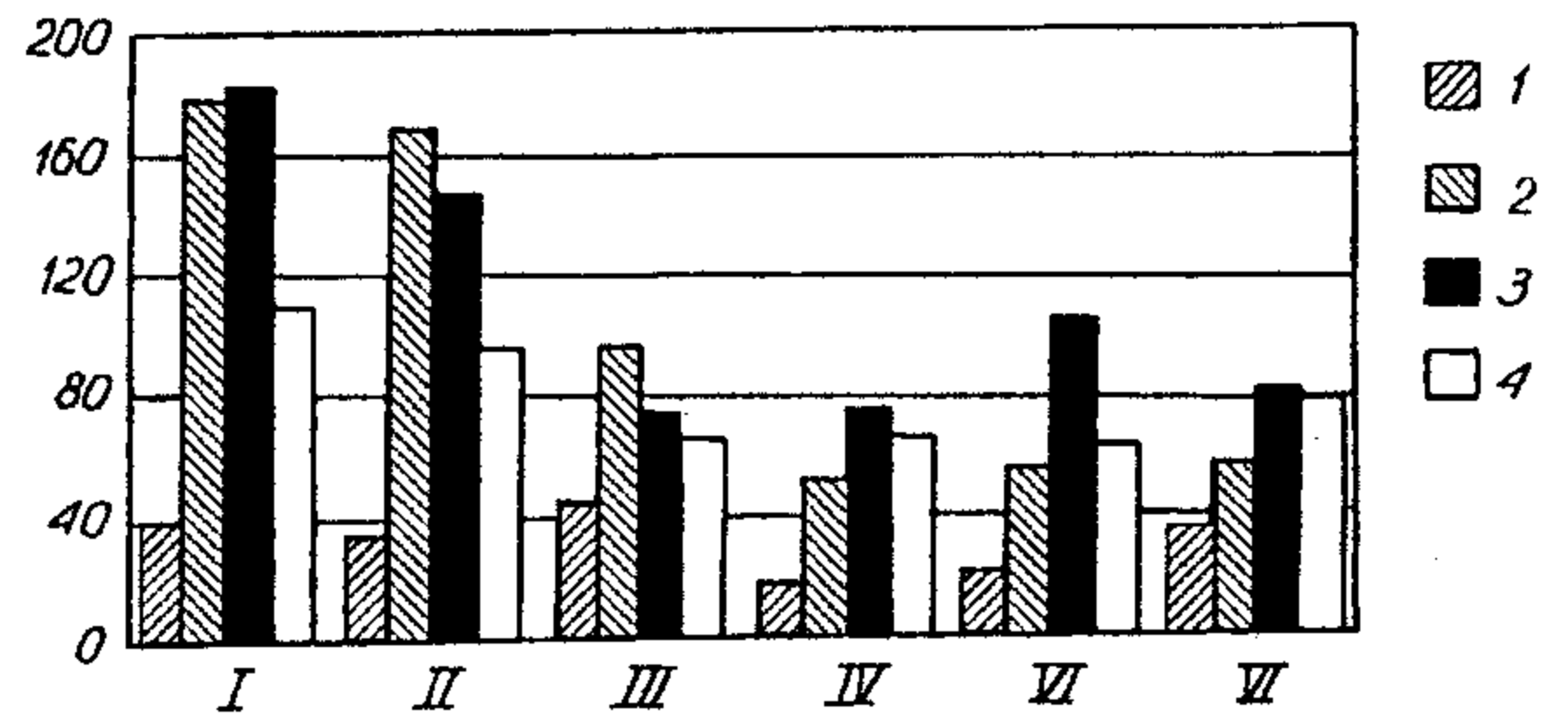


Рис. 3

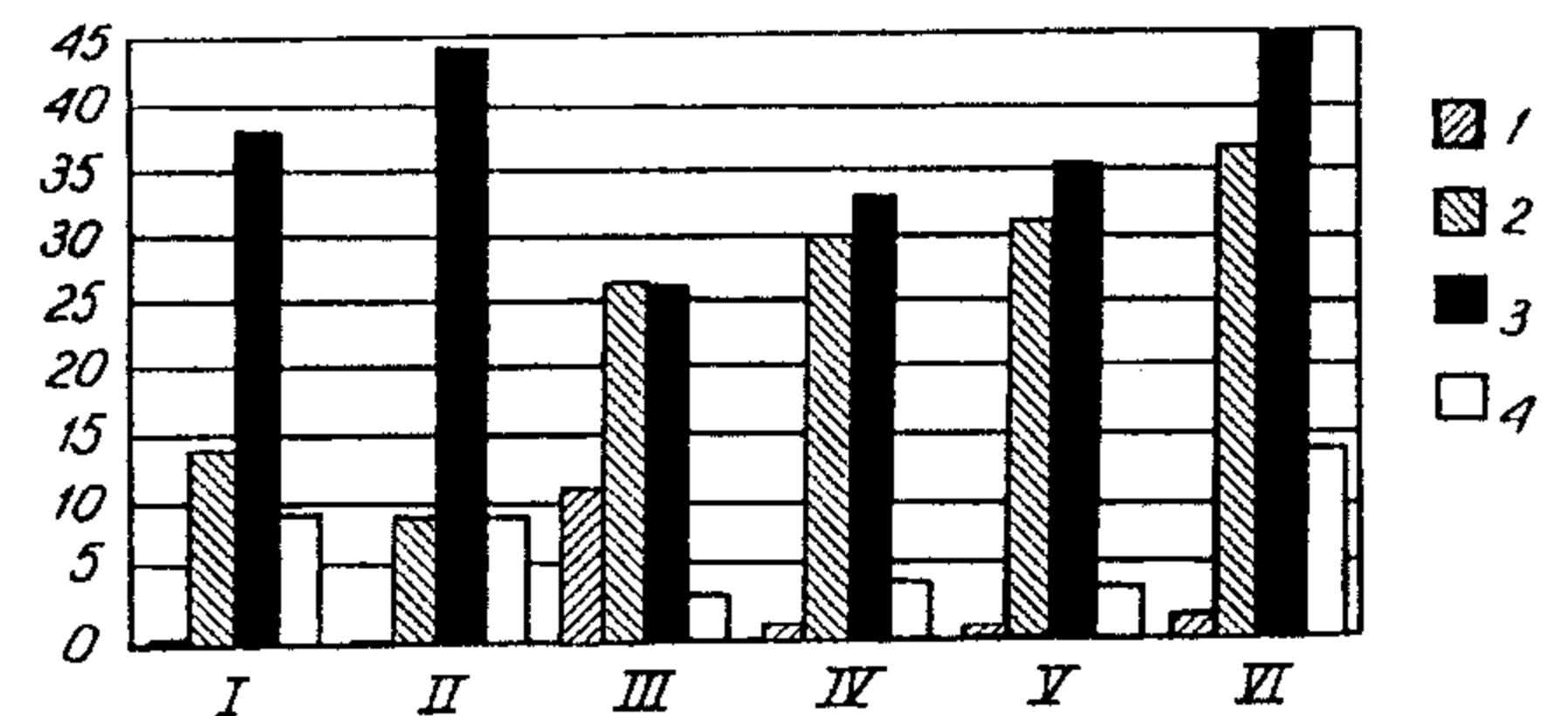


Рис. 4

Рис. 3. Влияние препаратов на КоНА-индуцированную пролиферацию клеток селезенки.

По оси ординат — включение ^3H -тимидина (в имп/мин $\cdot 10^{-3}$). I — спонтанная пролиферация; 2—4 — КоНА в дозах соответственно 5, 10 и 25 мкг/мл. I — пролиферация клеток интактных мышей; II — изменение пролиферации клеток интактных мышей под влиянием производного ИЗА; III — изменение пролиферации клеток интактных мышей под влиянием ГОС; IV — пролиферация клеток мышей с РТПХ-индуцированным ГН; V — изменение пролиферации клеток больных мышей под влиянием производного ИЗА; VI — изменение пролиферации клеток больных мышей под влиянием ГОС.

Рис. 4. Влияние препаратов на КоНА-индуцированную пролиферацию клеток тимуса.

I — пролиферация тимоцитов интактных животных; II — изменение пролиферации тимоцитов интактных животных под влиянием производного ИЗА; III — изменение пролиферации тимоцитов интактных животных под влиянием ГОС; IV — пролиферация тимоцитов с РТПХ-индуцированным ГН на 5-м месяце болезни; V — изменение пролиферации тимоцитов больных животных под влиянием производного ИЗА; VI — изменение пролиферации больных животных под влиянием ГОС на пролиферирующие тимоциты. Остальные обозначения те же, что на рис. 3.

Но, вероятно, наиболее интересная картина наблюдается при исследовании пролиферативных свойств тимоцитов под влиянием препаратов в норме и при патологии. На рис. 4 видно, что под влиянием ИЗА у нормальных мышей при подавлении эндогенно активированных клеток и пролиферации Т-хелперов под влиянием субоптимальной дозы митогена достоверно стимулируется пролиферация в ответ на оптимальную дозу митогена, тогда как на 5-м месяце болезни мы наблюдаем лишь угнетение спонтанной пролиферации, а стимулирующее влияние выражено незначительно. ГОС оказывает оппозитное влияние на тимоциты в норме и при патологии. В норме усиливаются супрессорные влияния, что подавляет пролиферацию Т-хелперов при оптимальной и субоптимальной дозах митогена и усиливает угнетение ответа на высокую дозу КонА, причем количество эндогенно активированных клеток возрастает. При патологии же усиливается пролиферативный ответ на субоптимальную и оптимальную дозы митогена за счет активации субпопуляций Т-хелперов, что могло отменять влияние Т-супрессоров при высокой дозе КонА (хотя, возможно, и наоборот — первичное угнетение Т-супрессоров вело к усилению пролиферации Т-хелперов).

Следовательно, лечебный эффект изученных препаратов опосредуется различными клеточными субпопуляциями как в норме, так и при патологических состояниях, когда клеточный состав органов иммунной системы значительно изменяется.

Выводы

1. ЛПС-стимулированный синтез спленоцитами IgG *in vitro* достоверно повышается под влиянием исследованных препаратов — производных ИЗА и ГОС у мышей с РТПХ-индуцированным ГН на 5-м месяце болезни.

2. Производное ГОС оказывает оппозитное влияние на ЛПС-стимулированную пролиферацию клеток селезенки в норме и при патологии (соответственно подавляя и стимулируя), производное ИЗА не оказывает на нее существенного действия.

3. Производное ГОС угнетает пролиферацию при оптимальной и субоптимальной дозах митогена у интактных мышей и стимулирует ее при высокой дозе митогена у мышей с РТПХ-индуцированным ГН на 5-м месяце болезни. Произ-

водное ИЗА оказывает оппозитное влияние на пролиферацию при оптимальной дозе митогена в норме и при патологии (соответственно подавляя и стимулируя ее).

4. Производное ГОС стимулирует спонтанную пролиферацию тимоцитов как у интактных, так и у больных мышей. При оптимальной дозе митогена под действием препарата наблюдается подавление ответа в норме и его стимуляция при РТПХ-индуцированном ГН, а при высокой дозе митогена наблюдаются подавление у интактных животных и стимуляция у больных.

5. Производное ИЗА, усиливая пролиферативный ответ тимоцитов при оптимальной и субоптимальной дозах митогена у здоровых мышей, практически не влияет на него у мышей с РТПХ-индуцированным ГН.

ЛИТЕРАТУРА

1. Брондз Б. Д. Т-лимфоциты и их рецепторы в иммунологическом распознавании. — М., 1987.
2. Коен С., Уорд П. А., Мак-Класки Р. Т. Механизмы иммунопатологии. — М., 1983.
3. Николаева М. Ф., Кондратенко И. В., Кузьмина Е. Г. и др. // Иммунология. — 1991. — № 5. — С. 27—30.
4. Павлюк А. С., Беда М. В., Веселова А. В. и др. // Там же. — 1993. — № 3. — С. 21—24.
5. Bierrer E. B., Schreiber S. C., Burakoff S. J. // Eur. J. Immunol. — 1991. — Vol. 21. — P. 439—445.
6. Bruijn J. A., Van Elven E. H., Corver V. E. et al. // Clin. exp. Immunol. — 1989. — Vol. 76. — P. 284—289.
7. De Berardinis P. // Ann. Ist. Super. Sanita. — 1991. — Vol. 27. — P. 41—50.
8. Doric M., Gligora. // Folia biol. — 1991. — Vol. 37. — P. 131—133.
9. Gagnon L., Fillion L. G., Dubois C. et al. // Agents and Actions. — 1989. — Vol. 26. — P. 141—147.

Поступила 09.03.94

EFFECTS OF INDOLILE-3-ACETATE DERIVATIVE AND GERMANIUM-ORGANIC DRUG ON MICE WITH GLOMERULONEPHRITIS INDUCED BY CHRONIC GRAFT-VERSUS-HOST DISEASE. - O. P. Kolesnikova, M. N. Tuzova, I. V. Safronova, O. T. Kudaeva, V. A. Kozlov

Summary. Two new immunomodulators synthesized in the Irkutsk Institute of Organic Chemistry were tested on different models *in vitro* both on lymphocytes of intact mice and of mice with GVH-induced GN on the 5th month of the disease. Great influence was exerted on IgG synthesis *in vitro* by splenocytes of mice with GN. Different effects were observed on LPS- and ConA-induced proliferation of splenocytes and ConA-induced proliferation of thymocytes both in intact and GVH-induced GN mice. Moreover, the effects of immunomodulators were opposite in health and disease and closely related to doses of mitogen. This allowed us to relate the action of these new drugs with different cell subpopulations responding to different doses of mitogens in health and disease according to immunogenesis of GVH-induced GN.