

О. П. Колесникова, М. Н. Тузова, В. А. Козлов

СКРИНИНГ ИММУНОАКТИВНЫХ СВОЙСТВ ПРОИЗВОДНЫХ АЛКАНКАРБОНОВЫХ КИСЛОТ И ГЕРМАНИЙОРГАНИЧЕСКИХ СОЕДИНЕНИЙ IN VIVO

Институт клинической иммунологии СО РАМН, Новосибирск

В научной литературе недостаточно сведений о иммуноактивных свойствах препаратов из группы производных алканкарбонных кислот и германийорганических соединений. Анализ литературы [5, 7, 8, 10] и патентной информации свидетельствует об активном поиске новых иммуноактивных соединений среди этих химических групп как потенциальных лекарственных средств для лечения вторичных иммунодефицитов, аутоиммунных заболеваний, опухолевых процессов и других нарушений функции иммунной системы. Например, созданы запатентованное противоопухолевое средство на основе органических соединений германия (Япония, 3-31168 от 02.05.91, А61К 31/28 Сато Поити), серосодержащие производные алканкарбонных кислот, известные как противовирусные, гипоаллергизирующие препараты, проявляющие терапевтическую активность, а также для лечения аутоиммунной патологии (США, 5082836 от 21.01.92, А61К 31/385 Santen Pharmaceutical Co Ltd; Германия, 4035456 от 16.05.91, А61К 31/385 Asta Pharma A. G.), трекрезан (крезацин) — кислородосодержащее производное индолил-3-ацетата, проявляющее выраженные адаптогенные и противовирусные свойства [4, 6].

В настоящей работе проведен скрининг иммуноактивных свойств соединений, относящихся к группе германийорганических и производных алканкарбонных кислот, предоставленных нам Иркутским институтом органической химии СО РАН. Исследованы 3 вещества, относящиеся к производным алканкарбонных кислот и имеющие обозначения VM-38-80, VM-38-81 и VM-2-84 (первые два — азотсодержащие производные,

третье — серосодержащее) и 3 вещества германийорганической природы: ГР-1, ГР-2 и ГР-3.

Методика исследований. В работе использованы мыши-гибриды (C57BL/6 × DBA/2)_{F₁}, полученные из питомника "Столовая" РАМН.

Определение количества антигелообразующих клеток (АОК) в селезенке мыши. Количество АОК в селезенке мышей *in vivo* оценивали на 4-е сутки после внутривенной иммунизации животных эритроцитами барана (ЭБ) по количеству локальных зон гемолиза в полужидкой среде модифицированным методом (Cunningham, 1968 г.).

В серии опытов перед иммунизацией мышей подвергали субэталному обучению в дозе 3 Гр. Исследуемые препараты подопытным мышам вводили 3-кратно внутриверношинно в дозе 50 мг на 1 кг массы тела с интервалом 48 ч, животным контрольной группы в том же объеме (0,5 мл) вводили растворитель (апиrogenную воду для инъекций).

Определение кожной реакции гиперчувствительности замедленного типа (ГЗТ) *in vivo*. Влияние препарата на выраженность реакции ГЗТ оценивали по стандартной методике локальной ГЗТ (Crowle, 1975 г.). Превавторитно подопытным мышам вводили растворы изучаемых соединений в дозе 50 мг/кг с интервалом 24 ч. В день последней инъекции вводили сенсибилизирующую дозу антигена (0,5 мл 0,5% раствора ЭБ в питательной среде 199 НПО "Вектор"), а на 4-е сутки — разрешающую дозу антигена (50% раствор ЭБ) в количестве 50 мкл под подошвенный апопневроз задней лапы. В контрлатеральную лапу вводили растворитель в том же объеме. Учет реакции осуществлялся через 24 ч по величине местного отека. Результаты выражали в процентах и сравнивали с таковыми в контрольной группе животных, не получивших инъекции препаратов.

Оценка кооперативного взаимодействия Т- и В-лимфоцитов *in vivo*. При изучении воздействия препаратов на кооперацию Т- и В-лимфоцитов *in vivo* использовали модель адоптивного переноса сингенных клеток. Донорам клеток делали инъекции изучаемых препаратов в дозе 50 мг/кг 3-кратно внутриверношинно с интервалом 24 ч. Через 1 сут после последней инъекции донорские клетки костного мозга (в дозе 10⁷) и тимуса (в дозе 20 · 10⁷) трансплантировали детально обученным реципиентам (Методические материалы по экспериментальному и клиническому испытанию действия фармакологических средств, Минздрав СССР, Москва, 1984 г.). Одновременно проводили иммунизацию реципиентов ЭБ (в дозе 2 · 10⁸). Результаты оценивали на 8-е сутки методом локального гемолиза по количеству АОК (Cunningham, 1968 г.).

Результаты и обсуждение. Влияние соединений VM-2-84, VM-38-80, VM-38-81, ГР-1, ГР-2 и ГР-3 на массу лимфоидных органов. В данной серии опытов изучаемые вещества вводили интактным мышам-гибридам (C57BL/6 × DBA/2)_{F₁} внутриверношинно 3-кратно с интервалом 48 ч. Через 48 ч после последней инъекции измеряли массу лимфоидных органов: тимуса, селезенки и пахового лимфоузла. В качестве контроля использовали органы как интактных животных, так и мышей, которым в том же режиме вводили растворитель (апиrogenную воду для инъекций). Результаты представлены на рис. 1. Как показали полученные нами данные, наиболее значительные изменения изученные соединения вызывают в тимусе и лимфоузлах. Максимальное Т-лимфотропное действие оказывают соединения VM-2-84 (достоверно) и ГР-3 (недостоверно), что выражается в существенном снижении массы тимуса. Напротив, соединения VM-38-80 и VM-38-81 вызывают увеличение массы тимуса (недостоверно) и массы пахового лимфоузла (достоверно) так же, как и соединение ГР-3, что можно связать с прижизненным усилением миграции клеток в эти органы.

Таким образом, на самом раннем этапе скрининга установлено, что соединения VM-2-84 и ГР-3 обладают выраженными Т-лимфотропными свойствами.

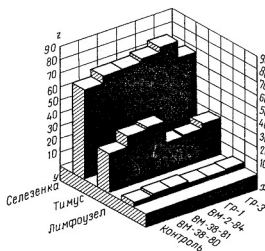


Рис. 1. Влияние прижизненного введения препаратов на массу лимфоидных органов интактных мышей.

По оси Y — лимфоидные органы, по оси X — используемые препараты, по оси Z — масса исследованных органов (в мг).

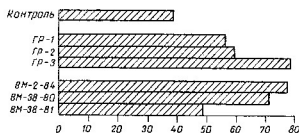


Рис. 2. Влияние препаратов в дозе 50 мг/кг на гуморальный иммунный ответ интактных мышей.

По оси абсцисс (здесь и на рис. 3, 5 и 7) — число АОК, $\cdot 10^3$; по оси ординат (здесь и на рис. 3 — 6) — исследуемые препараты.

Влияние соединений ВМ-38-80, ВМ-38-81, ВМ-2-84, ГР-1, ГР-2 и ГР-3 на первичный гуморальный иммунный ответ *in vivo* у интактных мышей и мышей с иммуносупрессией. В данной серии опытов вещества вводили 3-кратно внутривенно с интервалом 48 ч в объеме 0,5 мл в дозах 5 и 50 мг/кг. В день последней инъекции проводили иммунизацию животных 2% ЭБ внутривенно. Количество АОК в селезенке подсчитывали на 4-е сутки. Результаты экспериментов представлены на рис. 2. Как показали полученные нами данные, все соединения обладают иммуностимулирующими свойствами в дозе 50 мг/кг в отношении гуморального иммунного ответа у интактных мышей, выраженными, однако, в разной степени. Следует отметить, что вещества ВМ-2-84 и ГР-3, обладающие Т-лимфотропными свойствами и существенно уменьшающие массу тимуса, также стимулируют антителообразование.

Вероятно, иммуностимулирующий эффект этих соединений реализуется на уровне синтеза лимфокинов и(или) монокинов (например, интерлейкина-1).

С целью проверки этого предположения интактным мышам (C57BL/6 \times DBA/2) F_1 3-кратно внутривенно с интервалом 48 ч вводили препараты ГР-3 и ВМ-2-84 в дозе 50 мг/кг. Затем в асептических условиях забирали клетки селезенки у этих и интактных мышей и инкубировали при 37°C и 5% CO_2 в течение 4 ч. Собранный супернатант в объеме 0,25 мл вместе с 0,25 мл 4% ЭБ вводили внутривенно интактным животным. На 4-е сутки определяли число АОК. Была зарегистрирована стимуляция антителообразования по сравнению с контролем (рис. 3).

При сравнении одного из препаратов (ВМ-2-84) с известным противостатическим лекарственным средством индометацином мы отметили, что эффект изучаемого соединения лишь в низкой дозе сравним с действием индометацина: в сред-

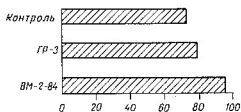


Рис. 3. Влияние супернатантов от инкубации клеток селезенки на гуморальный иммунный ответ.

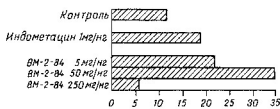


Рис. 4. Влияние различных доз ВМ-2-84 на гуморальный иммунный ответ в сравнении с индометацином.

ней дозе он является достоверно стимулирующим, а в высокой — достоверно подавляющим (рис. 4).

Далее исследовали влияние соединений на гуморальный иммунный ответ у мышей с пострadiационной иммуносупрессией после сублетального облучения в дозе 3 Гр, которым затем было проведено 7 инъекций изучаемых соединений с интервалом 48 ч. Как видно на рис. 5, вещества ГР-1, ГР-2, ВМ-38-81 и ВМ-2-84 достоверно стимулировали гуморальный иммунный ответ у сублетально облученных мышей.

Таким образом, результаты серии экспериментов по изучению влияния препаратов на IgM-антителогенез *in vivo* свидетельствуют о выраженном стимулирующем действии соединений данных групп на антителообразование как у интактных животных, так и у мышей с пострadiационной иммуносупрессией.

Скрининг указанных групп соединений по их влиянию на первичный гуморальный иммунный ответ позволяет заключить, что данные вещества обладают свойством, условно обозначенным нами как В-лимфотропное стимулирующее действие.

Влияние соединений ВМ-38-80, ВМ-2-84, ВМ-38-81, ГР-1, ГР-2 и ГР-3 на ГЗТ у интактных мышей. Интактным мышам (C57BL/6 \times DBA/2) F_1 вводили исследуемые вещества 3-кратно внутривенно в дозе 50 мг/кг с интервалом 48 ч. В день последней инъекции вводили сенсибилизирующую дозу антигена, а через 24 ч — разрешающую дозу (см. раздел "Методика исследований"). Выраженность реакции изучали по величине отека лапы и выражали в процентах. У интактных мышей она приближалась к 50%, а у мышей, получавших препараты ГР-2, ГР-3, ВМ-38-80 и ВМ-2-84, была достоверно подавлена (рис. 6).

Таким образом, скрининг иммуноактивных свойств, характеризующих клеточный иммунный ответ *in vivo*, выявил Т-лимфотропное иммуносупрессивное действие у части соединений. Необходимо отметить, что наиболее стабильно Т-лимфотропную активность проявляет соединение ВМ-2-84 из группы производных индолил-3-ацетата, а из германийорганических соединений — ГР-3.

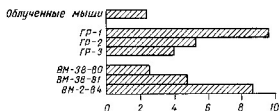


Рис. 5. Влияние препаратов на иммунный ответ у мышей с пострadiационной иммуносупрессией.

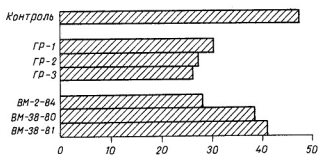


Рис. 6. Влияние препаратов на выраженность локальной реакции ГЗТ у intactных мышей.

По оси абсцисс — величина отека лимы (в %).

Несмотря на то что и другие соединения подавляют ГЗТ и стимулируют антителообразование, механизмы их иммуноактивного действия различны [11–13]. Эти предположения основаны на том, что эффект стимуляции антителообразования у intactных животных соединением ГР-3 выражен сильнее и не имеет дозовой зависимости по сравнению с соединением ВМ-2-84. Соединение ГР-3 у иммуносупрессированных животных не проявляет стимулирующих свойств в отношении IgM-антител, тогда как соединение ВМ-2-84 эффективно стимулирует IgM-антителообразование в период пострадиационного восстановления.

Действительно, данные о влиянии соединений ВМ-2-84 и ГР-3 на кооперацию Т- и В-лимфоцитов *in vivo* подтверждают эти предположения.

Влияние соединений ГР-3 и ВМ-2-84 на кооперацию Т- и В-лимфоцитов *in vivo*. В данной серии экспериментов доноры лимфоидных клеток (клетки тимуса — источник Т-лимфоцитов, клетки костного мозга — источник В-лимфоцитов) получали 3-кратно внутривенно по 50 мг/кг субстанции ГР-3 и ВМ-2-84 с интервалом 24 ч. Еще через 24 ч у них в асептических условиях забирали клетки тимуса и костного мозга и готовили клеточную суспензию, которую вводили внутривенно летально облученным реципиентам (см. раздел "Методика исследований"). Одновременно проводили иммунизацию ЭБ. Результаты эксперимента представлены на рис.7.

Как показали полученные данные, кооперативное взаимодействие Т- и В-лимфоцитов от мышей, получавших инъекции ВМ-2-84 и ГР-3, снижено по сравнению с таковым у intactных мышей. Можно отметить, что супрессорный эффект соединений в кооперативном взаимодействии Т-

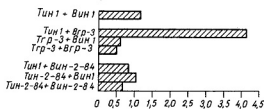


Рис. 7. Влияние препаратов на кооперативное взаимодействие Т- и В-лимфоцитов.

По оси ординат — различные составы клеток донора, введенные реципиенту. Т_{тим} + В_{вим} — контроль.

лимфоцитов с intactными В-лимфоцитами выражен более значительно, чем при взаимодействии intactных Т-лимфоцитов с В-лимфоцитами доноров, получавших инъекции соединений. Более того, наблюдается достоверная стимуляция антителообразования в комбинации Т_{инт.} + В_{ГР-3}.

Следовательно, механизм стимуляции антителогенеза под влиянием соединений ВМ-2-84 и ГР-3 действительно различен. Вероятно, соединение ГР-3 оказывает прямое В-лимфотропное действие, тогда как соединение ВМ-2-84 стимулирует первичный гуморальный иммунный ответ через влияние цитокинов (в частности, интерлейкина-1) [3, 14].

Выводы

1. Производные алканкарбоновых кислот и германийорганические соединения оказывают выраженное иммунотропное действие у intactных животных: стимулируют гуморальный и подавляют клеточно-опосредованный иммунный ответ в условиях *in vivo*.

2. Наибольший эффект обнаружен у соединения ВМ-2-84 (из 3 производных алканкарбоновых кислот) и вещества ГР-3 (из 3 германийорганических соединений), заключающийся в степени выраженности и восприимчивости их иммуноактивных свойств.

ЛИТЕРАТУРА

1. Арцимович Н. Г. // Гематол. и трансфузиол. — 1988. — Т. 33, № 2. — С. 77–81.
2. Казакович П., Ровка С. // Синтез и изучение физиологически активных веществ. — Вильнюс, 1988. — С. 63–65.
3. Кефал В. И. // Успехи химии. — 1991. — Т. 32. — С. 221–228.
4. Шаринский В. С., Жук Е. А. // Тер. арх. — 1990. — Т. 62, № 12. — С. 125–132.
5. Шаринский В. С., Жук Е. А. // Иммунология. — 1991. — № 3. — С. 7–10.
6. Atal S. K., Sharma M. L., Kaul A., Khajuria A. // J. Ethnopharmacol. — 1986. — Vol. 18. — P. 133–141.
7. Azuma J., Renoux G. // Advanc. Immunopharmacol. — 1989. — Vol. 4. — P. 259–262.
8. Bach J.-I. // Allergologie. — 1989. — Vol. 12. — P. 14–17.
9. Chirigos M. A., Chiba Tatsuo. // Advanc. Immunopharmacol. — 1989. — Vol. 4. — P. 263–265.
10. Costello R., Mawas C., Olive D. // Eur. Cytokine Netw. — 1993. — Vol. 4, N 2. — P. 139–146.
11. Doric M., Gligora M. // Folia biol. (Praha). — 1991. — Vol. 37, N 2. — P. 131–134.
12. Hamburger M., Hostettmann K. // Phytochemistry. — 1991. — Vol. 30. — P. 3864–3874.
13. Paul W. E., Seder R. A. // Cell. — 1994. — Vol. 76. — P. 241–252.
14. Zanussi C., Meroni P. L. // Rass. clin. sci. — 1988. — Vol. 64, N 10–12. — P. 171–175.

Поступила 04.11.95

SCREENING OF IMMUNOACTIVE PROPERTIES OF ALKANCARBONIC ACIDS DERIVATIVES AND GERMANIUM-ORGANIC COMPOUNDS IN VIVO — O. P. Kolesnikova, M. N. Tazova, V. A. Kozlov

Summary. In the screening of immunoreactive properties using *in vivo* models of immunity the authors tested three indole-3-acetyl-N- and -S-derivatives and three germanium-organic compounds. The direct T-cell inhibiting and indirect B-cell stimulating effects were established. Mechanisms of action and applications of similar compounds as potential immunomodulators are discussed.