

РОССИЙСКАЯ АКАДЕМИЯ НАУК
Иркутский институт химии им. А. Е. Фаворского СО РАН

РОССИЙСКАЯ АКАДЕМИЯ МЕДИЦИНСКИХ НАУК
НИИ клинической иммунологии СО РАМН

Новокузнецкий научно-исследовательский
химико-фармацевтический институт

ВИЛИМ

ДОКЛИНИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

Новосибирск
2008

*О.П. Колесникова, О.Т. Кудяева, Е.В. Ненашева,
И.А. Гольдина, Е.В. Гойман, А.П. Лыков, И.В. Сафронова,
Т.В. Долгих, *Е.В. Рудякова, К.В. Гайдуль*
НИИ клинической иммунологии СО РАМН,
*Иркутский институт химии им. А.Е. Фаворского СО РАН

СЕЛЕКТИВНЫЕ ИММУНОДЕПРЕССИВНЫЕ СВОЙСТВА НОВОГО ПРОИЗВОДНОГО ИНДОЛИЛ-ТИОАЛКАНКАРБОНОВОЙ КИСЛОТЫ

Как известно, в основе патогенеза расстройств иммунитета лежит дисбаланс про- и противовоспалительных цитокинов, продуцируемых Th1 и Th2 лимфоцитами (соответственно превалирование клеточного или гуморального иммунного ответа). При аутоиммунных заболеваниях (рассеянный склероз, ревматоидный артрит) выявляется повышенная активность Th1 клеток, при системной красной волчанке, аутоиммунных васкулитах, некоторых видах анемий, аллергии – Th2 клеток. С учетом этих данных понятно, что иммуномодулирующая терапия при аутоиммунных заболеваниях должна включать препараты, понижающие активность Th1 клеток и повышающие активность Th2 клеток. Одним из направлений в иммуномодулирующей терапии аллергических заболеваний является применение препаратов, снижающих активность Th2 клеток и повышающих активность Th1 клеток, т.е. иммуномодуляторов. Однако в настоящее время нет препаратов, разрешенных к медицинскому применению, с селективной способностью изменять баланс Th1/Th2 в нужном направлении [5]. Сегодня в качестве селективных иммуотропных препаратов применяются только иммунодепрессанты циклоспорин А и зенапакс. Селективность действия этих препаратов заключается в подавлении активации Т-лимфоцитов и, на клеточном уровне, антигензависимого образования/высвобождения цитокинов (включая провоспалительный ИЛ-2) или блокадой рецепторов к этому цитокину, что приводит к подавлению его биологической активности.

На основании скрининга иммуноактивных свойств новых соединений – производных арилгетероалканкарбонновых кислот на интактных животных выявлены соединения с потенциальной способностью изменять баланс продукции про/противовоспалительных цитокинов соответственно Th1 или Th2 клетками. Выделена группа соединений – структурных аналогов трекрезана – солей 2-метилфеноксисуксусной кислоты с биогенными

аминами (диметилэтаноломином, метилдиэтаноломином, диэтаноломином), способных активировать Th1 клетки. К соединениям, изменяющим активность Th2 лимфоцитов, отнесено соединение под шифром ВМ-7-02 ряда трис-(2-гидроксиэтил) аммониевых солей производных индолил-3-тиоуксусной кислоты, обладающее иммуносупрессивными свойствами (максимальное подавление миелопоеза, IgM ответа, иммуносупрессивные эффекты в культуре *in vitro* на спонтанную и митоген-стимулированную пролиферацию клеток селезенки). При этом эффект подавления первичного IgM ответа соединением, введенным в разные сроки относительно антигена, был различным. Целью настоящего исследования являлось изучение механизмов иммунодепрессивного действия соединения ВМ-7-02 при использовании других экспериментальных моделей, доз и схем его применения.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В работе использовали здоровых половозрелых животных – мышей линии DBA/2 и мышей гибридов (CBAxС57BL/6)F1 (CBF1), (C57BL/6xDBA/2)F1 (BDF1) обоего пола, 8-10-недельного возраста, массой тела 18-20 г. Разброс в группах по исходной массе тела не превышает $\pm 10\%$. Контрольные и опытные животные одного возраста и получены одновременно из одного питомника (“Рассвет”, г. Томск). До и в период эксперимента контрольные и опытные животные содержались в виварии в одинаковых условиях: стандартных пластиковых клетках с мелкой древесной стружкой (не более 10 особей) на стандартном рационе. Все исследования проводились в одно и то же время суток (утром). Опыты проводили в соответствии с правилами, принятыми Европейской конвенцией по защите животных (Страсбург, 1986), и одобренных комитетом по биомедицинской этике ГУ НИИ клинической иммунологии СО РАМН. Здоровые лица, включенные в исследование, были подвергнуты стандартному клинико-лабораторному обследованию (осмотр, общий анализ крови, исследование крови на маркеры гепатитов, ВИЧ, реакцию Вассермана). Данные параметры соответствовали нормальным значениям.

Соединение растворяли в среде RPMI и использовали в разных дозах относительно LD₅₀. Контрольным животным в таком же объеме и режиме вводили растворитель соединения (среда RPMI). Контрольные и опытные группы состояли не менее чем из 8-10 мышей.

Модель иммунокомплексного гломерулонефрита вызывали у самок В6D2F1 мышей двукратным с недельным интервалом внутривенным введением лимфоидных клеток от самок родительской линии DBA/2 [11]. Содержание белка в моче определяли калориметрически с красителем

Kumsai brilliant blue (Loba Feinchemie) на Titertec Multiscan, длина волны λ 570 nm. В опытах использовали мышей со стойкой протеинурией и содержанием белка 3 мг/мл и более (белок в моче определялся неоднократно).

Количество IgM АОК в селезенке мышей оценивали на 4-е сутки после иммунизации по количеству зон локального гемолиза в полужидкой среде модифицированным методом [9]. Для иммунизации животных использовали ЭБ в дозе 10^7 . Результаты выражали в абсолютном количестве IgM АОК в селезенке. Количество IgG АОК определяли в селезенке на пике иммунного ответа (на 5-е сутки после вторичной иммунизации) методом локального гемолиза [14]. Клетки селезенки инкубировали 2 часа при 39°C в камерах с ЭБ, компонентом морской свинки и кроличьей антисывороткой против мышиногo IgG (разведение в 2000 раз). Зоны гемолиза подсчитывали под увеличением $\times 42$. Результаты выражали в абсолютном количестве IgG АОК в селезенке. Для оценки влияния соединения на клеточный иммунный ответ использовали реакцию гиперчувствительности замедленного типа (ГЗТ) [8]. Соединение вводили внутрибрюшинно одновременно с сенсibilизирующей дозой антигена (0,25% ЭБ в объеме 0,5 мл внутрибрюшинно) и далее в течение 4-х суток ежедневно (включая день введения разрешающей дозы антигена). На 4-е сутки после сенсibilизации вводили разрешающую дозу антигена под подошвенный апоневроз правой задней лапы (50% ЭБ в объеме 50 мкл). В контрлатеральную лапу вводили растворитель (RPMI) в том же объеме. Контрольным животным в таком же объеме и режиме вводили растворитель соединений. Учет реакции производили через 24 часа после введения разрешающей дозы ЭБ, величину отека оценивали штангенциркулем. Результаты выражали в %.

Изучение экспрессии гена ИЛ-4 проводили методом обратнo-транскриптазной полимеразной цепной реакции [12,13]. Геномную РНК получали методом фенольной экстракции с использованием тест-системы ВектоРНК-экстракция (Вектор-Бест, Новосибирск) из мононуклеарных клеток крови, культивированных в течение 24 часов [7]. Амплификацию полученной ДНК осуществляли с использованием пар олигонуклеотидных праймеров, гомологичных консервативным участкам антипараллельных цепей ДНК, в программируемом амплификаторе «Терцик» (ДНК-технологии, Москва). Продукты амплификации анализировали методом электрофореза в 2% геле агарозы с добавлением бромистого этидия (ВектоДНК-ЭФ, Вектор-Бест, Новосибирск). При амплификации с праймерами β -актина и последующей электрофоретической оценке результатов все образцы периферической крови здоровых лиц демонстрировали наличие фрагмента соответствующего размера (462 п.н.). Полученный сегмент

ДНК выявляли в виде дискретной полосы после электрофоретического разделения молекул ДНК. Положительными считали образцы с наличием в геле видимой полосы ДНК, с размером, соответствующим ожидаемому (ИЛ-4-224 п.н.).

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

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Изучение иммуносупрессорных свойств соединения ВМ-7-02 *in vivo* проводили на экспериментальной модели РТПХ-индуцированного иммунокомплексного гломерулонефрита – Th2-зависимой модели аутоиммунного заболевания, при котором иммунологический механизм опосредован активацией и преобладанием Th2-лимфоцитов и соответствующих цитокинов (в первую очередь ИЛ-4), поликлональной активацией В-лимфоцитов, сопровождающейся увеличением синтеза аутоантител широкого спектра (в том числе анти-ДНК антител), формированием иммунных комплексов, что приводит к системному иммунокомплексному воспалительному процессу в почках – нефриту и протеинурии. Такой тип повреждения почек сравним морфологически и функционально с системной красной волчанкой у человека [6].

Проведено 3 серии опытов. В I серии мышам со стабильной протеинурией на протяжении 2-х месяцев и содержанием белка в моче от 3,0 до 6,5 мг/мл проведено курсовое введение соединения: 5 ежедневных внутрибрюшинных инъекций в дозе 300 мг/кг. Установлено, что через 5 дней после последнего введения соединения в 83% случаев наблюдается достоверное снижение протеинурии: в среднем в группе до лечения протеинурия была равна 5,1 мг/мл, после лечения – 3,6 мг/мл ($P < 0,05$). Во II серии опытов соединение в дозе 5 мг/кг вводили *per os*, курс составил 10 введений. Аналогичным образом вводили препарат сравнения азатиоприн в дозе 5 мг/кг. Измерение протеинурии проводили через сутки после последнего введения препаратов. Под влиянием азатиоприна в 40% случаев наблюдается незначительное снижение белка в моче (в среднем на 8%), соединение вызывает снижение протеинурии в 80% случаев, снижение протеинурии в среднем под действием соединения составляет 41%. В III серии опытов соединение в дозе 10 мг/кг (200 мкг/мышь) вводили *per os*, курс составил 10 введений. Аналогичным образом вводили препарат сравнения азатиоприн в дозе 5 мг/кг. Измерение протеинурии проводили через сутки после последнего введения препаратов. В 83% случаев под влиянием азатиоприна снижается протеинурия (в среднем снижение составило 55%). Под

влиянием соединения в 80% случаев наблюдается снижение протеинурии, в среднем снижение составило 42%. Анализируя полученные данные можно заключить, что соединение вне зависимости от дозы и способа введения в 80% случаев (общее количество мышей с гломерулонефритом – 16) приводит к снижению белка в моче. При сравнении соединения ВМ-7-02 и азатиоприна по токсичности можно отметить, что соединение вызывает иммунодепрессивный эффект в дозе на порядок ниже относительно LD_{50} , чем азатиоприн. По данным морфологического исследования применение и азатиоприна, и соединения ВМ-7-02 приводит к уменьшению выраженности структурных изменений гломерул, тубулярной альтерации, интерстициального гемосидероза, а также мононуклеарной инфильтрации. Соединение ВМ-7-02 по сравнению с азатиоприном приводит к максимальному уменьшению мононуклеарной клеточной инфильтрации, исчезновению геморрагического синдрома и появлению тенденции к регенерации эндотелиоцитов капилляров клубочков. И цитостатик (азатиоприн) и исследуемое соединение снижают активацию иммунной системы преимущественно на уровне В-клеточного звена. В целом по эффективности соединение не уступает широко используемому в клинической практике иммунодепрессанту азатиоприну, а в некоторых отношениях превосходит его [4].

Подтверждением иммуносупрессорного эффекта соединения, т. е. его способности подавлять Т-зависимую активацию В-клеток являются данные, полученные на интактных мышах в модели первичного гуморального иммунного ответа. Известно, что иммунизация интактных мышей Т-зависимым антигеном – эритроцитами барана приводит также к активации *in vivo* В-клеток и последующему синтезу антител в селезенке. Для первичного IgM ответа соединение в дозах 1, 5, 10 мг/кг вводили одновременно с антигеном и далее в течение 3-х суток ежедневно. Соединение вводили внутрибрюшинно или внутрижелудочно. Для вторичного IgG ответа соединение в дозах 1, 5, 10 мг/кг вводили одновременно с первичной внутрибрюшинной иммунизацией 0,25% ЭБ в объеме 0,5 мл и далее в течение 3-х суток ежедневно. Соединение вводили внутрибрюшинно. Через 30 дней после первичной иммунизации проводили вторичную иммунизацию ЭБ в дозе 10^7 /мышь внутривенно.

Как видно из данных таблицы 1, вне зависимости от способа введения соединения (внутрижелудочно или внутрибрюшинно) наблюдается дозозависимое подавление первичного гуморального иммунного IgM ответа. При использованном режиме введения соединения выявляется дозозависимая стимуляция вторичного гуморального иммунного IgG ответа. Соединение в дозах 1, 5, 10 мг/кг не оказывает влияния на выраженность клеточного иммунного ответа, оцененного в тесте ГЗТ.

Влияние соединения на первичный и вторичный гуморальный иммунный ответ

Г р у п п ы	Число IgM АОК / с е л е з е н к у		Число IgG АОК/селезенку
	внутрижелудочно	внутрибрюшинно	внутрибрюшинно
Контроль	6024	9620	26140
Соединение:			
1 мг/кг	6761	5843	28067
5 мг/кг	2925*	5508	39814
10 мг/кг	2112*	3111*	41687*

* - достоверно относительно контроля, $P < 0,05$.

Ранее показано, что индукция хронической РТПХ в полуаллогенной системе (перенос лимфоидных клеток от родителя → F1 гибридам) приводит наряду с Th2-зависимым вариантом иммунопатологии (lupus) к появлению у части мышей Th1-зависимого варианта (nonlupus). Варианты иммунопатологии кроме клинических отличий (наличие или отсутствие протеинурии) имеют различия в параметрах клеточного и гуморального иммунного ответа, функциональных свойств В-лимфоцитов (изменение соотношения подклассов иммуноглобулинов). Мыши с Th1-вариантом характеризуются сниженным соотношением IgG1/IgG2α, тогда как у мышей с Th2-вариантом иммунопатологии наблюдается его увеличение, возрастающее по мере развития заболевания [1]. В лаборатории разработана оригинальная экспериментальная модель, позволяющая в условиях *in vivo* оценивать возможность доминирования Th1 или Th2 иммунного ответа под действием препаратов, физических тренировок. Установлено, что с помощью агентов, специфически активирующих Th1 или Th2 клетки, возможна модуляция течения РТПХ в полуаллогенной системе и изменение частоты вариантов иммунопатологии [3]. Испытывали влияние соединения ВМ-7-02 на возможность модуляции течения хронической РТПХ: реципиентам за 3 дня до начала индукции РТПХ и спустя 2 недели после переноса клеток селезенки родителя вводили соединение в дозе 10 мг/кг. Определение протеинурии проводили через 2 и 3 месяца после индукции хронической РТПХ. Данные представлены в таблице 2.

Таблица 2

Частота развития lupus-нефрита (%) и концентрация белка в моче (мг/мл)
у реципиентов с хронической РТПХ

Группа	Через 2 месяца		Через 3 месяца	
	частота	белок	частота	белок
хРТПХ	22,2 (2/9)	1,4	33,3 (3/9)	2,2
хРТПХ+ВМ-7-02	14,3 (1/7)	1,1	16,7 (1/6)	1,6

Таким образом, соединение ВМ-7-02 снижает число реципиентов *lupus*⁺, что, по-видимому, изменяет баланс Th1/Th2 в сторону Th1-клеток.

Изучение соотношения подклассов IgG подтверждает это предположение: под влиянием соединения ВМ-7-02 наблюдается увеличение концентрации IgG2a и соответственно изменение соотношения IgG1/IgG2a в сторону IgG2a. У мышей *nonlupus* от 2,08 до 1,63 и у мышей *lupus* от 2,76 до 2,0, т.е. в сторону Th1-зависимого подкласса IgG2a, что согласуется с ранее выявленными иммуноактивными свойствами этого соединения – способностью ингибировать Th2 ответ (рис. 1).

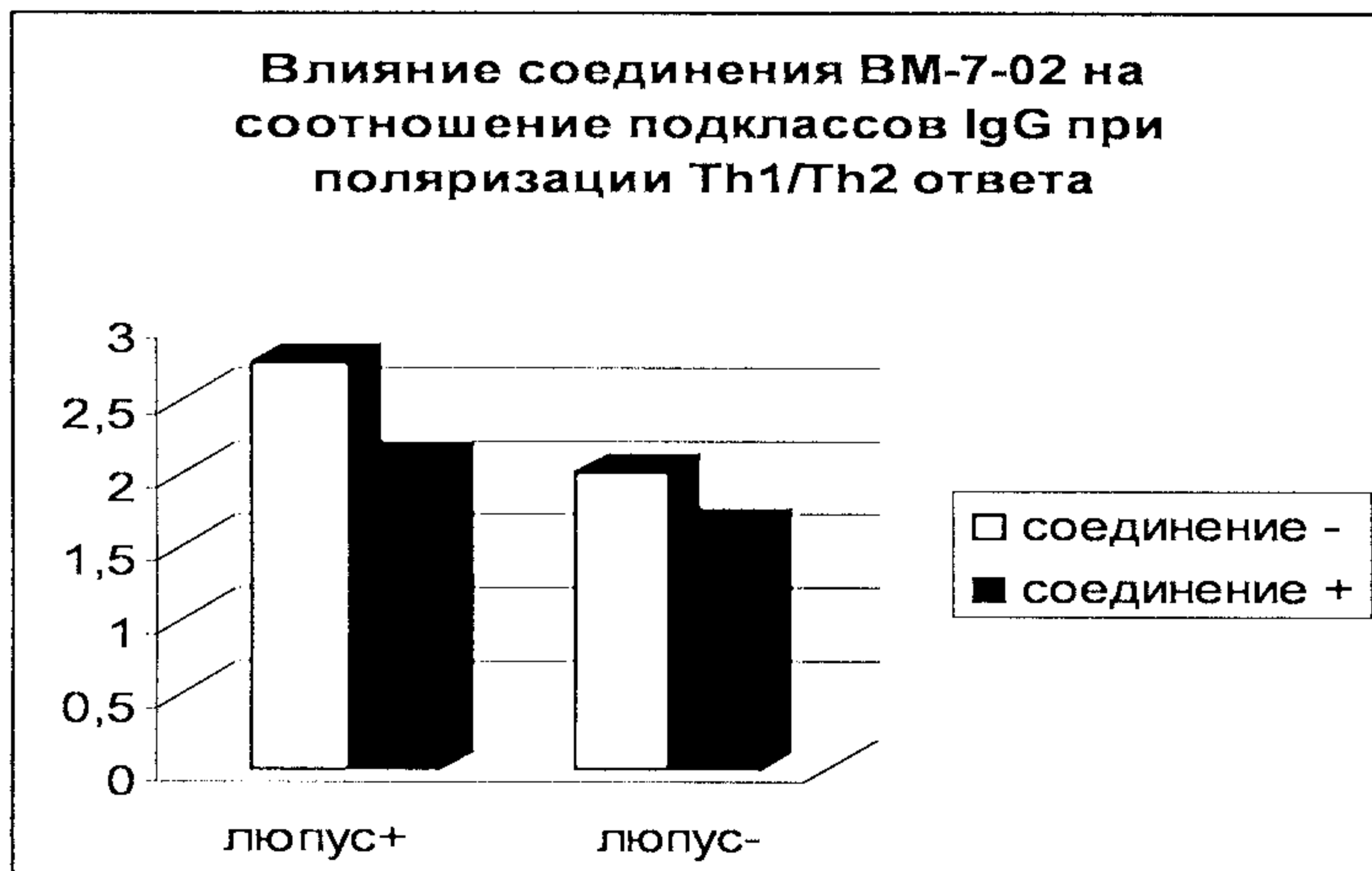


Рис.1. Влияние соединения ВМ-7-02 на содержание IgG разных подклассов

Таким образом, используя параметр соотношения подклассов иммуноглобулинов IgG1/IgG2 α в сыворотке как интегральный показатель доминирования Th1/Th2 лимфоцитов, можно заключить, что соединение ВМ-7-02 обладает способностью изменять баланс про- и противовоспалительных цитокинов, соответственно синтезированных Th1 или Th2-лимфоцитами в направлении Th1.

По данным [10] в модели Th2-зависимого варианта иммунопатологии (*lupus*) ИЛ-4 – основной цитокин, ответственный за активацию В-клеток. Проведено изучение влияния соединения ВМ-7-02 в дозе 30, 100, 300 мкг/мл на экспрессию гена ИЛ-4 и продукцию цитокина ИЛ-4 в МНК периферической крови человека. Установлено, что соединение ВМ-7-02 в культуре нестимулированных МНК человека вызывает подавление экспрессии гена ИЛ-4 во всех исследованных дозах, в культуре стимулированных липополисахаридом *E. Coli* 011:B4 МНК соединение вызывает

подавление экспрессии ИЛ-4 в дозах 100 мкг/мл и 300 мкг/мл. Соединение во всех испытанных дозах не влияет на спонтанную продукцию ИЛ-4, ФГА-стимулированная продукция этого цитокина подавляется в дозах 100 и 300 мкг/мл. Отличия в действии соединения на спонтанную экспрессию гена ИЛ-4 и спонтанную продукцию этого цитокина могут быть связаны с тем, что мРНК, очевидно, всех цитокинов следует относить к короткоживущим, нестабильным (достаточно выраженная временная мобильность) в отличие от рибосомальных и транспортных РНК, относящихся к стабильным молекулам [2].

Заключение. В настоящем исследовании получены данные об иммуносупрессорных свойствах соединения из ряда трис-(2-гидроксиэтил) аммониевых солей производных индолил-3-тиоуксусной кислоты в экспериментальных моделях Th2-зависимой активации В-клеток (в модели Th2-опосредованного иммунокомплексного гломерулонефрита и модели IgM-ответа на Т-зависимый антиген у интактных мышей). Не обнаружено какого-либо иммуноактивного эффекта соединения на клеточные реакции иммунитета - ГЗТ у интактных мышей. Подавление активности Th2-клеток сопровождается девиацией в сторону Th1-зависимого иммунного ответа. Возможно, селективность иммуносупрессии в экспериментальных моделях связана с избирательным подавлением продукции ИЛ-4 в Th2-лимфоцитах: соединение подавляет спонтанную и стимулированную экспрессию гена ИЛ-4 и стимулированную продукцию этого цитокина в мононуклеарных клетках крови здоровых лиц.

ЛИТЕРАТУРА

1. Козлов В.А., Кудаева О.Т., Колесникова О.П. и др. Иммунология. 2002. № 3. С. 143–146.
2. Козлов В.А. Система цитокинов. Новосибирск, 2004. С. 23–37.
3. Кудаева О.Т., Гойман Е.В., Лыков А.П. и др. Бюлл. экспер. биологии и медицины. 2005. Т. 140. № 9, С. 325–327.
4. Лимонов В.Л., Шурлыгина А.В., Робинсон М.В. и др. Бюлл. СО РАМН. 2005. № 2 (116). С. 50–54.
5. Хаитов Р.М., Пинегин Б.В. Иммунология. 2003. № 4. С. 196–203.
6. Appleby P., Webber D.G., Bowen J.G. Clin. and Exp. Immunol. 1989. V. 78. № 3. P. 449–453.
7. Chomczynski P., Sacchi N. Analyt. Biochem. 1987. V. 162. P. 156–159.
8. Crowle A.J. Adv. Immunol. 1975. № 20. P. 197–264.
9. Cunningham A.J., Szenberg A. Immunology. 1968. V. 14. № 4. P. 599–600.
10. Doutrelepont J.M., Moser M., Leo O. et al. Clin. Exp. Immunol. 1991. V. 83. № 1. P. 133–136.
11. Kimura M., Shimada K., Kanai Y. Clin. Exp. Immunol. 1987. Vol. 69. № 2. P. 385–393.

12. Roth M.J., Tanese N., Goff S.P. *J. Biol. Chem.* 1985. V. 260. P. 9326–9335.
13. Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T. *Molecular cloning: a Laboratory manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York, 1989.
14. Sterzl J., Riha I. *Nature*. 1965. V. 208. № 13. P. 858–859.