

**В.Л. Лимонов, А.В. Шурлыгина, М.В. Робинсон, Е.В. Мельникова,
О.П. Колесникова, К.В. Гайдуй, А.Н. Мирскова, В.А. Труфакин**

ВЛИЯНИЕ ПРОИЗВОДНОГО ИНДОЛИЛТИОАЛКАНКАРБОНОВОЙ КИСЛОТЫ (СОЕДИНЕНИЯ ВЛ-11-02) НА ПРОЛИФЕРАТИВНУЮ АКТИВНОСТЬ ИММУНОКОМПЕТЕНТНЫХ КЛЕТОК У ИНТАКТНЫХ МЫШЕЙ

ГУ НИИ физиологии СО РАМН, Новосибирск
ГУ НИИ клинической и экспериментальной лимфологии СО РАМН, Новосибирск
ГУ НИИ клинической иммунологии СО РАМН, Новосибирск
Иркутский институт химии им. А.Е. Фаворского СО РАН

Было предпринято исследование влияния соединения ВЛ-11-02 (производного индолилтиоалканкарбонической кислоты) на пролиферативную активность клеток центральных и периферических органов иммунитета — тимуса, селезенки и паховых лимфатических узлов. Выявлено, что данное вещество обладает дозозависимой антипролиферативной активностью, оказывает угнетающее влияние на пролиферацию Т- и В-клеточного звена иммунитета в центральных и периферических органах иммунной системы, что позволяет рассматривать его как потенциальный лекарственный препарат иммунодепрессивного действия. При этом, по-видимому, данное соединение обладает менее выраженной токсичностью по сравнению с другими иммунодепрессантами (в частности циклофосфаном), так как его введение отменяет стимуляцию апоптоза в тимусе в ранние сроки постциклофосфановой регенерации.

Ключевые слова: производные органических алканкарбонических кислот, иммунокомпетентные клетки, клеточный цикл, органы иммунитета

В настоящее время актуальной проблемой является создание новых лекарственных средств для лечения расстройств иммунитета. Современные знания о патогенезе многих заболеваний, связанных с нарушениями иммунных функций, выдвигают требования к поиску иммуноактивных препаратов селективного действия среди новых химических групп. Экспериментальное и клиническое изучение механизмов иммуноактивного действия одного из алканаммониевых производных органических алканкарбонических кислот — трекрезана показало, что он обладает выраженными гомо- и иммунопозмодулирующими, а также противовоспалительными и интерферонгенными свойствами [1, 2].

На основании скрининга иммуноактивных свойств нескольких соединений этого класса одно из производных индолилтиоалканкарбонической кислоты (соединение ВЛ-11-02) было охарактеризовано как одно из наиболее активных, обладающее миело- и иммунодепрессивными свойствами. Однако механизм и возможная селективность действия до сих пор во многом остаются неизвестными. Исследование клеточной пролиферации и анализ клеточного цикла дают информацию о

функциональном состоянии иммунокомпетентных клеток. Данные параметры определенным образом меняются при антигенном, регуляторном и химическом воздействии на клеточные культуры и на целостный организм [3, 4, 5]. В связи с этим нами было предпринято исследование влияния соединения ВЛ-11-02 на пролиферативную активность клеток центральных и периферических органов иммунитета — тимуса, селезенки и паховых лимфатических узлов.

Методика

Экспериментальные животные

В работе использовали здоровых половозрелых животных — мышей линии СВА и мышей гибридов (СВАхС57ВL/6)F1 (СВF1) обоего пола, 8-10 недельного возраста, массой тела 18-20 г. Разброс в группах по исходной массе тела не превышал ±10%. Контрольные и опытные животные были 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: в стандартных пластиковых клетках с мелкой древесной стружкой (не более 10 особей), на стандартном рационе. Все исследования

проводили в одно и то же время суток (утром). Исследуемое соединение вводили внутривентрально один раз в сутки в течение 5-7 дней в дозе 1/10 LD₅₀. Контрольным животным в таком же объеме и режиме вводили растворитель. Испытания проводили в несколько серий опытов, соответственно каждая серия опытов имела свой контроль. Все эксперименты выполнены в соответствии с Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных (приказ Минздрава СССР от 12.08.77 г.).

Оценка влияния соединения на спонтанную, Соn А и PWM-стимулированную пролиферацию клеток селезенки in vitro

Клетки селезенки мышей СBF1 культивировали в круглодонных планшетах для иммунологических реакций («Linbro») при +37°C в атмосфере 5% CO₂ и 95% воздуха. Абсолютное количество клеток, вносимых в лунку, составляло 200000. Клетки стимулировали митогенами — конканавалиномА (Con A, Sigma) или митогеном лаконоса (PWM, Sigma). Концентрации митогенов подбирали предварительным титрованием и использовали в оптимальной дозе, что составляло для Con A 2 мкг/мл, а для PWM — 1 мкг/мл. Соединение ВЛ-11-02 в трех дозах вносили в лунки одновременно с митогенами. Пролиферативную активность клеток оценивали по включению ³H-тимидина в ДНК делящихся клеток. Метку вносили за 16 час до конца культивирования по 1 мКи в каждую лунку планшета. По окончании инкубации клетки собирали на стеклянно-волоконистые фильтры («Flow Lab») с помощью аппарата Harvester («Titertek»). Радиоактивность подсчитывали в жидкостном сцинтилляционном счетчике «Delta» (США). Результаты выражали в имп/мин включенного тимидина на 2×10⁵ клеток, представлены средние данные по триплету.

Оценка соотношения клеток в различных фазах клеточного цикла в лимфоидных органах in vivo

Исследование влияния соединения ВЛ-11-02 на прохождение иммунокомпетентных клеток

по фазам клеточного цикла in vivo проводили в модели постциклофосфановой регенерации. Мышам-самкам линии СВА вводили циклофосфан однократно внутривентрально в изотоническом растворе хлорида натрия в дозе 200 мг/кг, соединение ВЛ-11-02 в дозе 10 мг/кг вводили внутривентрально на следующий день после введения циклофосфана и далее в течение 10 дней. Контролем служила группа интактных мышей. Животных забивали под эфирным наркозом на 4-е и 10-е сутки после введения циклофосфана, извлекали тимус и паховые лимфатические узлы, готовили из них клеточную суспензию мягким раздавливанием в стеклянном гомогенизаторе Клетки дважды отмывали холодным ФСБ (рН=7,4) и фиксировали в 70% этаноле. Через час образцы центрифугировали и удаляли спирт. Фиксированные клетки инкубировали в 1 мл раствора пропидиума иодида (10μg/ml в ФСБ) и РНКазы (0,2mg/ml) в течение 15 минут при комнатной температуре. По окончании времени инкубации образцы анализировали методом проточной цитофлуориметрии.

Результаты обрабатывали по программе Statistica 5. Достоверность различий оценивали по критерию U (Манна-Уитни) и с применением многомерного дисперсионного анализа MANOVA.

Результаты

Данные таблицы 1 демонстрируют, что соединение ВЛ-11-02, представляющее ряд трис-(2-гидроксизетил)аммониевых солей производных индолил-3-тиоуксусной кислоты и ее производных, обладает дозозависимой антипролиферативной активностью. Доза 30 мкг/мл достоверно подавляет СоnА-стимулированную пролиферацию клеток селезенки. Доза 30 мкг/мл подавляет и СоnА, и PWM-стимулированную пролиферацию. Доза 300 мкг/мл угнетает и спонтанное, и индуцированное обоими митогенами клеточное деление. При этом подавление индуцированной пролиферации носит значительно более глубокий характер, чем при низких дозах. Таким образом, по-видимому, Т-клеточное звено является

Таблица 1

Влияние соединения ВЛ-11-02 на спонтанную, PWM- и СоnА-индуцированную пролиферацию клеток селезенки интактных мышей СBF1 in vitro

Экспериментальная группа	Доза (мкг/мл)	Спонтанная пролиферация	PWM-стимулированная пролиферация	СоnА-стимулированная пролиферация
Соединение ВЛ-11-02	3	2702	6440	13266
	30	2396	5658	12968
	300	570	141	125
Контроль		3236	7306	16010

Примечание: значения, выделенные жирным шрифтом, достоверно отличаются от контроля (p<0,05).

Таблица 2

Количество клеток в различных фазах клеточного цикла на 4-е сутки постциклофосфановой регенерации ($M \pm \text{ст. отклонение}$)

Показатель	Интактный контроль	Циклофосфан	Циклофосфан + соединение ВЛ-11-02
Количество клеток в тимусе ($\times 10^7$)	6,52 \pm 1,95	0,66 \pm 0,17*	0,35 \pm 0,15*#
Количество клеток в лимфоузле ($\times 10^6$)	0,62 \pm 0,12	0,25 \pm 0,11*	0,12 \pm 0,07*
Гиподиплоидные клетки в тимусе (%)	0,54 \pm 0,25	1,84 \pm 0,71*	1,35 \pm 1,22
Тимоциты в фазе G0+G1 (%)	88,1 \pm 1,52	92,74 \pm 2,23	95,15 \pm 0,78*
Тимоциты в фазе S (%)	8,02 \pm 1,75	4,26 \pm 1,22*	2,47 \pm 0,51 *#
Тимоциты в фазе G2+M (%)	3,33 \pm 0,67	1,16 \pm 0,63*	1,03 \pm 0,40*
Гиподиплоидные клетки в лимфоузле (%)	0,52 \pm 0,81	0,29 \pm 0,17	0,68 \pm 0,59
Клетки лимфоузла в фазе G0+G1 (%)	96,99 \pm 0,89	94,51 \pm 3,28	97,52 \pm 1,45
Клетки лимфоузла в фазе S (%)	1,02 \pm 0,50	4,31 \pm 2,86	1,68 \pm 1,61
Клетки лимфоузла в фазе G2+M (%)	1,46 \pm 0,5	0,88 \pm 0,67	0,12 \pm 0,16*#

Примечание: * – достоверные отличия от интактного контроля; # – достоверные отличия от циклофосфана ($p < 0,05$).

Таблица 3

Количество клеток в различных фазах клеточного цикла на 10-е сутки постциклофосфановой регенерации ($M \pm \text{ст. отклонение}$)

Показатель	Интактный контроль	Циклофосфан	Циклофосфан + соединение ВЛ-11-02
Количество клеток в тимусе ($\times 10^7$)	5,28 \pm 0,80	2,16 \pm 0,80	0,96 \pm 0,19*#
Количество клеток в лимфоузле ($\times 10^6$)	11,00 \pm 5,37	4,96 \pm 2,72	3,00 \pm 1,76
Гиподиплоидные клетки в тимусе (%)	1,65 \pm 1,18	1,86 \pm 1,46	0,67 \pm 0,44
Тимоциты в фазе G0+G1 (%)	85,94 \pm 3,53	85,09 \pm 1,58	88,54 \pm 1,75#
Тимоциты в фазе S (%)	8,54 \pm 2,52	9,19 \pm 0,96	7,72 \pm 1,16
Тимоциты в фазе G2+M (%)	3,87 \pm 0,88	3,85 \pm 0,57	3,07 \pm 0,49*#
Гиподиплоидные клетки в лимфоузле (%)	0,32 \pm 0,19	1,38 \pm 0,90	1,51 \pm 1,20
Клетки лимфоузла в фазе G0+G1 (%)	98,15 \pm 1,08	96,87 \pm 1,75	96,40 \pm 1,89
Клетки лимфоузла в фазе S (%)	1,44 \pm 1,09	1,59 \pm 0,99	1,97 \pm 1,09
Клетки лимфоузла в фазе G2+M (%)	0,07 \pm 0,09	0,16 \pm 0,12	0,12 \pm 0,20

Примечание: * – достоверные отличия от интактного контроля; # – достоверные отличия от циклофосфана ($p < 0,05$).

более чувствительным к антипролиферативному действию соединения ВЛ-11-02, так как СовА-стимулированная пролиферация подавляется уже минимальной дозой. Кроме того, низкие дозы препарата, не влияя на процессы спонтанного клеточного деления, угнетают функциональную активность иммунокомпетентных клеток, снижая их способность адекватно отвечать на стимуляцию митогеном.

Метод с включением H^3 -тимидина характеризует в большей степени интенсивность протекания синтетической фазы клеточного цикла. Кро-

ме того, данные исследований в культуре *ex vivo* не всегда могут быть использованы для объяснения эффектов иммуноактивных воздействий на уровне целостного организма. Поэтому следующим этапом работы было изучение соотношения клеток, находящихся на различных фазах клеточного цикла в тимусе и паховых лимфатических узлах *in vivo* в модели постциклофосфановой регенерации.

Из таблицы 2 видно, что на 4-е сутки после введения циклофосфана по сравнению с интактным контролем происходит снижение общего ко-

личества клеток в тимусе и лимфатическом узле, а также относительного количества тимоцитов в фазах S и G2+M клеточного цикла. Повышается относительное количество гиподиплоидных клеток в тимусе. Таким образом, к 4-м суткам постциклофосфановой регенерации наблюдается супрессия синтеза ДНК и пролиферации клеток тимуса. Возрастание доли гиподиплоидных тимоцитов может свидетельствовать об усилении апоптотических процессов в органе.

Введение исследуемого вещества после инъекции циклофосфана приводит к еще большему снижению общего количества тимоцитов. В лимфоузле количество клеток снижено по сравнению с контролем, но не отличается от циклофосфана. Относительное количество гиподиплоидных тимоцитов достоверно не отличается от такового у интактных животных. По сравнению с циклофосфаном и интактным контролем оказалось сниженным количество тимоцитов в синтетической фазе и клеток лимфоузлов в премитотической и митотической фазах клеточного цикла. Таким образом, на 4-е сутки после введения циклофосфана соединение ВЛ-11-02 оказывает супрессирующий эффект на пролиферативную активность клеток как центральных, так и периферических органов иммунитета.

На 10-е сутки постциклофосфановой регенерации (таблица 3) в группе с введением одного циклофосфана не обнаружено достоверных изменений параметров клеточного цикла по сравнению с интактным контролем. В группе животных, получавших соединение ВЛ-11-02, оказалось сниженным количество клеток в тимусе, относительное количество тимоцитов в премитотической и митотической фазе и повышенным — количество тимоцитов в фазе покоя (G0+G1). Таким образом, можно видеть, что исследуемое соединение замедляет постциклофосфановую регенерацию на поздних сроках преимущественно на уровне центрального органа иммунитета — тимуса — за счет снижения пролиферативной активности клеток, но не за счет усиления процессов апоптоза. Эти результаты согласуются с данными исследования пролиферации лимфоидных клеток *in vitro*, показавшими большую чувствительность Т-клеточного звена иммунной системы к антипролиферативному действию соединения ВЛ-11-02. Кроме того, они уточняют сведения, полученные при использовании в качестве экспериментальной модели клеточной культуры. Вполне вероятно, что отсутствие эффекта низкой дозы вещества на спонтанную пролиферацию, регистрируемую по включению ^3H -тимидина, касается только S-фазы клеточного цикла и митотическая активность все же супрессируется.

Заключение

Производное органилоксиалканкарбоновых кислот (соединение ВЛ-11-02) оказывает угнетающее влияние на пролиферацию Т- и В-клеточного звена иммунитета в центральных и периферических органах иммунной системы, что позволяет рассматривать его как потенциальный лекарственный препарат иммунодепрессивного действия. При этом, по-видимому, данное соединение обладает менее выраженной токсичностью по сравнению с другими иммунодепрессантами (в частности циклофосфаном), так как его введение отменяет стимуляцию апоптоза в тимусе в ранние сроки постциклофосфановой регенерации.

The influence of derivative of alkankarboxylic acids (compound VL-11-02) on the proliferative activity of immunocompetent cells at intact mice

V.L. Limonov, A.V. Shurylygina, M.V. Robinson, E.V. Melnikova, O.P. Kolesnikova, K.V. Gaidul, A.N. Mirskova, V.A. Trufakin

The influence of the compound VL-11-02 (the derivative of alkankarboxylic acids) on the proliferative activity of immunocompetent cells of the primary and secondary lymphoid organs — thymus, spleen and lymph node has been investigated at intact mice. It has been shown that this compound possessed dose-dependent antiproliferative activity, depressed proliferation of T- and B- cells in the primary and secondary lymphoid organs, that permitted to regard it as a potential immunodepressant drug. This compound is less toxic (in comparing with other immunodepressants) because its injection abolished apoptosis stimulation the thymus in early period of the postcyclophosphan regeneration.

Литература

1. Гемо- и иммунопозактивные свойства грекразана / О.П. Колесникова, О.Т. Кудашева, Т.Г. Сухенко и др. // ДАН, 2003. — Т. 391. — № 3. — С. 1-3.
2. К вопросу о механизмах иммуномодулирующего эффекта производных алканкарбоновых кислот / О.П. Колесникова, О.Т. Кудашева, М.Н. Тузова, И.В. Сафронова // Иммунология, 1994. — № 5. — С. 30-33.
3. Effect of saquinavir on proliferation and telomerase activity of human peripheral blood mononuclear cells / O. Franzese, A. Lombardi, A. Comandini et al. // Life Sci., 2001. — Vol. 69. — № 13. — P. 1509-1520.
4. Immunomodulation by diethylstilbestrol is dose and gender related: effect of thymocyte apoptosis and mitogen-induced proliferation / J.B. Calamine, R.M.J. Gogal, A. Lengi et al. // Toxicology, 2002. — Vol. 178. — № 2. — P. 101-118.
5. Khaled A.R. The role of cytokines in lymphocyte homeostasis / A.R. Khaled, S.K. Durum // Bio-techniques, 2002. — № 10. — P. 40-45.