

вводили внутривенно. Влияние препарата на колониеобразующую активность ПСКК костного мозга и селезенки оценивали по количеству экзогенных колоний в селезенке облученных мышей-реципиентов B6D2F1 [9]. Мышам-донорам ПСКК костного мозга и селезенки за сутки до забоя вводили однократно 20 мг/кг трекрезана. При создании модели иммунодефицита у мышей BALB/c и иммунокомплексного гломерулонефрита у мышей B6D2F1 за основу приняты рекомендации [5, 8]. Число антителообразующих клеток (АОК) в селезенке мышей *in vivo* определяли по числу гемолитических бляшек модифицированным методом локального гемолиза на 4-е сутки после внутривенной иммунизации  $2 \cdot 10^8$  эритроцитов барана [7]. Степень выраженности ГЗТ оценивали по величине отека лапы у sensibilizированных эритроцитами барана мышей после введения разрешающей дозы антигена. Мыши B6D2F1 с волчаночным нефритом стандартизованы по клиническим, иммунологическим, патоморфологическим критериям [3]. Протеинурию у мышей измеряли по индикаторной ленте «Альбуфан» (Чехо-Словакия).

Изучение иммунофармакодинамики трекрезана проводили в культуральных системах *in vitro* у доноров и больных ревматоидным артритом. Оценивали влияние препарата на пролиферацию мононуклеарных клеток (МНК), обогащенной культуры В-лимфоцитов и тестировали активность супернатантов клеток после инкубации с трекрезаном на пролиферацию МНК, активированных митогеном лаконоса (МЛ).

МНК выделяли центрифугированием цельной гепаринизированной венозной крови в градиенте плотности фикола-верографина [1]. Получение обогащенной суспензии моноцитов и обедненной моноцитами суспензии МНК проводили методом адгезии клеток к пластиковой поверхности [2]. Культуру МНК, освобожденных от Т-лимфоцитов, получали методом двукратного осаждения Е-розеткообразующих клеток в градиенте плотности фикола-верографина [4]. Обогащенную суспензию В-лимфоцитов получали из МНК после удаления моноцитов и двукратного осаждения Е-розеткообразующих клеток.

МНК культивировали в 96-луночных планшетах при 37 °С в газовом инкубаторе во влажной среде. Культуральная среда состояла из среды RPMI-1640 («Вектор», Новосибирск), дополненной 20 % пулированной человеческой сыворотки АВ (IV), 2 мМ НЕРЕС-буфера («Flow»), 0,3 мг/мл L-глутамин («Flow») и 100 мкг/мл гентамицина. Трекрезан добавляли в культуры в количестве 33 % от общего объема в первый день культивирования. В качестве митогенов использовали фитогемагглютинин (ФГА, Phytohemagglutinin M., «Calbiochem-behring Corp.», ФРГ, 5 мкг/мл) и МЛ (Pokeweed Mitogen, «Sigma», США, 10 мкг/мл). Продолжительность культивирования с ФГА составляла 72 ч, с МЛ — 120 ч. Интенсивность пролиферации оценивали по включению <sup>3</sup>H-тимидина в нуклеопротеидные фракции клеток. <sup>3</sup>H-тимидин вносили в культуры за 18 ч до конца культивирования в количестве 1 мкКи на 1 лунку. После окончания культивирования клетки осаждали на фильтры («Flow», Финляндия) с помощью Cell Harvester. Подсчет радиоактивности материала проводили в жидком сцинтилляционном счетчике SL-30 («Intertechnic», Франция).

Супернатанты клеток получали, инкубируя  $2 \cdot 10^6$  МНК или МНК, освобожденных от моноцитов, в 1 мл среды № 199, дополненной 2 % фетальной телячьей сыворотки (FCS, «Вектор», Новосибирск), или инкубируя  $1 \cdot 10^6$  моноцитов в среде № 199, дополненной 1 % FCS и 33 % трекрезана в разных кон-

Таблица 1. Влияние трекрезана на первичный гуморальный иммунный ответ у мышей разных генотипов

Линия мышей	Пол	Доза трекрезана, мг/кг	Количество АОК на селезенку
СВА	Самцы	—	89 963 ± 5 742
		2	154 218 ± 14 940
		20	173 804 ± 17 017*
B6D2 F1	Самцы	—	36 750 ± 5 017
		2	55 944 ± 6 870
		20	85 784 ± 9 830*
		200	71 161 ± 7 205

Примечание. Трекрезан вводили однократно, внутривенно, за 1 сут до эритроцитов барана. Звездочка — двукратный эффект.

Эксперим. и клин. фармакол.—1993.— Т. 56.— № 3.— С. 42—45.

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 1993

УДК 615.275.4.015.46.07

В. С. Ширинский, О. П. Колесникова,  
О. Т. Кудаева, Н. В. Семенова, Е. А. Жук,  
А. Н. Мирскова, М. Н. Тузова, Т. Г. Сухенко,  
М. Г. Воронков, В. А. Козлов

## ИММУНОАКТИВНЫЕ СВОЙСТВА ТРЕКРЕЗАНА

Институт клинической иммунологии (дир.—акад. РАМН В. П. Лозовой) СО РАМН, Новосибирск, 630091, ул. Ядринцовская, 14; Институт органической химии (дир.—акад. РАН М. Г. Воронков) СО РАН, Иркутск, 664033, ул. Фаворского, 1

Показано, что трекрезан *in vivo* обладает у мышей выраженными иммуноактивными свойствами: угнетает колониеобразующую активность полипотентных стволовых кроветворных клеток, стимулирует гемо- и лимфопоэз, антителообразование, обладает стойкой противовоспалительной активностью. *In vitro* препарат стимулирует пролиферацию мононуклеарных клеток человека, действуя на В-лимфоциты и усиливая продукцию лимфо- и монокинов.

**Введение.** Трекрезан [трис-(2-оксиэтил)аммония-орто-крезоксидат] — новый отечественный биостимулятор, синтезированный в Иркутском институте органической химии СО РАН. Широкий спектр биологической активности трекрезана позволяет предполагать у него наличие иммуноактивных свойств.

Задачей настоящего исследования явилось экспериментальное изучение иммуномодулирующей активности *vi vivo* и иммунофармакодинамики трекрезана *in vitro*.

**Методы исследования.** Экспериментальное изучение иммуноактивных свойств проводили в модельных системах, характеризующих влияние препарата на основные звенья иммунитета: колониеобразующую активность полипотентных стволовых кроветворных клеток (ПСКК) костного мозга и селезенки, антителогенез с учетом генного контроля силы иммунного ответа, реакции клеточного иммунитета — гиперчувствительности замедленного типа (ГЗТ). Использовали животных с такими иммунопатологическими состояниями, как прогрессирующий иммунодефицит и иммунокомплексный гломерулонефрит.

Исследования проводили на мышях линии СВА, С57В1/6, BALB/c, DBA/2, полученных из питомника «Светлые горы», а также гибридах первого поколения (С57В1/6 × DBA/2)F<sub>1</sub> (B6D2F1) разведения вивария Института клинической иммунологии СО РАМН (Новосибирск). Трекрезан

центрациях. Через 60 мин клетки отмывали от препарата и продолжали инкубацию еще 48 ч для МНК или 24 ч для моноцитов. В части экспериментов моноциты инкубировали с трекрезаном и индометацином (1 мкг/мл). После окончания инкубации клетки осаждали, собирали надосадочную жидкость (супернатанты), которую тестировали по влиянию на пролиферацию МНК, стимулированных МЛ, что позволило оценить влияние препарата на продукцию Т- и В-клеточных ростовых лимфокинов и монокинов.

**Результаты и их обсуждение.** В табл. 1 представлены данные о влиянии разных доз трекрезана на первичный гуморальный иммунный ответ.

Как видно, однократное введение трекрезана за 1 сут до иммунизации приводит к дозозависимой стимуляции IgM-антителообразования на Т-зависимый антиген у высоко- и низкоотвечающих мышей. Максимальный двукратный эффект наблюдается при использовании дозы 20 мг/кг. Не выявлено влияния препарата на индуктивную и эффекторную фазы ГЗТ.

Установлено, что трекрезан значительно влияет на колониобразующую активность ПСКК: количество колоний, образуемых ПСКК костного мозга на 8-е сутки, у интактных животных равно  $32,2 \pm 3,5$ , после введения трекрезана —  $12,7 \pm 1,4$ , количество колоний, образуемых ПСКК селезенки на 8-е сутки — соответственно  $35,5 \pm 2,3$  и  $18,4 \pm 1,6$  ( $p < 0,01$ ).

Показано, что трекрезан эффективен у мышей BalB/c с прогрессирующим иммунодефицитом, характеризующимся подавлением гемо- и лимфопоэза. В дозе 5 мг/кг в течение 1 мес (12 инъекций) препарат увеличивает количество ядросодержащих клеток в крови сразу после окончания курса инъекций: у контрольных животных  $9,24 \cdot 10^6$  ядросодержащих клеток в 1 мл, после курса лечения —  $17,4 \cdot 10^6$  клеток в 1 мл. Через 4 мес у нелеченых животных количество ядросодержащих клеток снизилось до  $6,96 \cdot 10^6$  в 1 мл, у леченных трекрезаном составило  $13,6 \cdot 10^6$  в 1 мл, что свидетельствует о стойком иммуностимулирующем эффекте трекрезана.

У мышей B6D2F1 с иммунокомплексным гломерулонефритом, сопровождающимся протеину-

рией от 2 до 15 г/л, после курса лечения трекрезаном в 80 % случаев наблюдается снижение протеинурии. Динамическое наблюдение за мышами свидетельствует, что наиболее эффективно и стойко противовоспалительные свойства трекрезана проявляются при раннем его назначении. Таким образом, трекрезан обладает выраженными иммуноактивными свойствами, оказывая влияние на стволовые элементы гемо- и лимфопоэза и антителогенез, что обуславливает его активность у мышей с иммунодефицитом и аутоиммунным гломерулонефритом.

На следующем этапе тестирования трекрезана мы оценили его влияние на пролиферацию МНК у доноров и больных ревматоидным артритом, выбор которого обусловлен наличием четких диагностических критериев при этом заболевании. Как следует из табл. 2, у доноров трекрезан стимулирует спонтанную пролиферацию МНК в 1,8—1,9 раза, ФГА-индуцированную в 1,5 раза, МЛ-индуцированную в 1,3 раза. У больных артритом препарат активизирует в 1,2—1,4 раза спонтанную и не влияет на активированную поликлональными митогенами пролиферацию МНК. Таким образом, трекрезан оказывает митогенное влияние на пролиферацию МНК, при этом соединение менее активно в отношении преактивированных *in vivo* или с помощью поликлональных митогенов МНК.

В культурах обогащенной популяции В-лимфоцитов трекрезан стимулирует спонтанную и активированную МЛ пролиферацию в 2,3—3 раза. Аналогичное, но менее выраженное по интенсивности влияние препарат оказывает и на больных ревматоидным артритом. Следовательно, стимуляция пролиферации МНК опосредована влиянием трекрезана на В-лимфоциты и, вероятно, на моноциты и Т-клетки, так как интенсивность стимуляции в культурах МНК и В-лимфоцитов под действием препарата различна.

С целью уточнения характера влияния трекрезана на моноциты и Т-лимфоциты была протестирована активность супернатантов клеток доноров и больных ревматоидным артритом. Интенсив-

Таблица 2. Влияние трекрезана на пролиферацию МНК

№ п/п	Тест-система	Концентрация трекрезана, г/мл	Здоровые доноры (n=10)		Больные ревматоидным артритом (n=10)	
			M ± m	p	M ± m	p
1	МНК	—	3 214 ± 274		4 175 ± 851	
2		10 <sup>-8</sup>	5 831 ± 627	2—1	4 472 ± 704	
3		10 <sup>-7</sup>	6 142 ± 937	3—1	4 995 ± 840	
4		10 <sup>-6</sup>	6 194 ± 610	4—1	5 997 ± 638	4—1
5	МНК+МЛ	—	17 146 ± 1 817		26 168 ± 2 681	
6		10 <sup>-8</sup>	22 076 ± 2 783	6—5	27 759 ± 2 918	
7		10 <sup>-7</sup>	21 690 ± 2 620	7—5	29 695 ± 3 168	
8		10 <sup>-6</sup>	21 789 ± 1 818	8—5	32 622 ± 3 469	
9	МНК+ФГА	—	16 533 ± 2 413		17 143 ± 2 375	
10		10 <sup>-8</sup>	24 858 ± 2 670	10—9	16 083 ± 1 571	
11		10 <sup>-7</sup>	22 497 ± 1 756	11—9	16 647 ± 1 904	
12		10 <sup>-6</sup>	1 586 ± 1 490		17 653 ± 2 147	
13	В-клетки	—	1 894 ± 354		2 225 ± 513	
14		10 <sup>-8</sup>	4 215 ± 1 528	14—13	3 072 ± 420	
15		10 <sup>-7</sup>	4 457 ± 542	15—13	4 085 ± 951	15—13
16		10 <sup>-6</sup>	5 772 ± 559	16—13	4 418 ± 604	16—13
17	В-клетки+МЛ	—	2 255 ± 291		2 315 ± 279	
18		10 <sup>-8</sup>	5 252 ± 659	18—17	4 458 ± 419	18—17
19		10 <sup>-7</sup>	5 347 ± 338	19—17	4 380 ± 331	19—17
20		10 <sup>-6</sup>	6 423 ± 380	20—17	5 437 ± 337	20—17

Примечание. Здесь и в табл. 3 различия между группами, указанными в графе «p», достоверны ( $p < 0,05$ ).

Таблица 3. Влияние супернатантов клеток после инкубации с трекрезаном на пролиферацию МНК

№ п/п	Тест-система	Супернатанты (СН)	Концентрация трекрезана, г/мл	Здоровые доноры (n=9)		Больные ревматоидным артритом (n=6)	
				M±m	p	M±m	p
1	МНК+МЛ	—	—	20 658±2 450		22 957±3 140	
2		СН МНК	—	22 602±1 125		19 591±1 078	
3			10 <sup>-8</sup>	17 386±1 025	3—2	25 388±2 586	3—2
4			10 <sup>-7</sup>	17 187±2 161	4—2	24 529±2 295	4—2
5			10 <sup>-6</sup>	16 509±1 338	5—2	32 189±2 423	5—2
6		СН МНК, освобожденных от моноцитов	—	24 275±2 104		23 310±2 310	
7			10 <sup>-8</sup>	21 655±2 546		54 117±4 508	7—6
8			10 <sup>-7</sup>	29 508±2 725	8—6	31 865±3 837	8—6
9			10 <sup>-6</sup>	31 267±2 159	9—6	61 979±3 463	9—6
10		СН моноцитов	—	22 895±1 158		25 069±2 846	
11			10 <sup>-7</sup>	24 417±3 640		33 308±3 571	11—10
12		СН моноцитов, инкубированных с индометацином	—	23 030±1 450		22 491±3 305	
13			10 <sup>-7</sup>	22 859±2 799		61 450±6 466	13—12
14	МНК, освобожденные от Т-лимфоцитов, +МЛ	—	—	5 374±617		5 455±526	
15		СН МНК	—	5 677±809		5 384±271	
16			10 <sup>-8</sup>	5 684±605		5 838±487	
17			10 <sup>-7</sup>	6 486±626		6 512±419	
18			10 <sup>-6</sup>	6 380±437		7 741±267	18—15
19		СН МНК, освобожденных от моноцитов	—	5 535±642		5 890±739	
20			10 <sup>-8</sup>	5 958±394		10 100±814	20—19
21			10 <sup>-7</sup>	7 387±621	21—19	6 178±743	
22			10 <sup>-6</sup>	7 904±555	22—19	9 773±835	22—19
23		СН моноцитов	—	6 725±840		4 756±467	
24			10 <sup>-7</sup>	6 324±548		8 835±467	24—23
25		СН моноцитов, инкубированных с индометацином	—	7 542±489		3 556±429	
26			10 <sup>-7</sup>	7 675±390		8 386±494	26—25

ность процессов пролиферации находится под контролем секретлируемых Т- и В-клеточных ростовых факторов. Предположительно, в супернатантах МНК, освобожденных от моноцитов, содержатся лимфокины, в супернатантах моноцитов — монокины, в супернатантах МНК — лимфокины и монокины. Среди медиаторов, вырабатываемых моноцитами, контроль пролиферации осуществляют преимущественно интерлейкин-1 (ИЛ-1) и простагландин Е2. Для дифференцированной оценки их роли в серии экспериментов использовали супернатанты моноцитов, инкубированных с индометацином, ингибитором простагландинсинтетазы. Тестируя супернатанты клеток в культуре МНК, активированных МЛ, оценивали влияние трекрезана на продукцию Т- и В-клеточных цитокинов, в культуре МНК, освобожденных от Т-лимфоцитов, — на продукцию только В-клеточных цитокинов.

Результаты тестирования супернатантов представлены в табл. 3. Как следует из табл. 3, супернатанты, полученные при инкубировании клеток без добавления трекрезана, не влияют на уровень пролиферации МНК. Супернатанты МНК доноров после инкубации с трекрезаном угнетают, супернатанты МНК, освобожденных от моноцитов, усиливают пролиферацию МНК, активированных МЛ, супернатанты моноцитов неактивны. В культуре МНК, освобожденных от Т-клеток и активированных МЛ, только супернатанты МНК, освобожденных от моноцитов, усиливают пролиферацию клеток. Все супернатанты клеток больных ревматоидным артритом усиливают пролиферацию и МНК, и МНК, освобожденных от Т-клеток. Эти данные позволяют предполагать, что под влиянием трекрезана в супернатантах образуются вещества с ростстимулирующей активностью. Следовательно, трекрезан, возможно, изменяет продукцию цитокинов.

Анализируя активность супернатантов, можно

предполагать, что у доноров трекрезан не влияет на продукцию монокинов, так как супернатанты моноцитов неактивны. Препарат усиливает продукцию В-клеточных ростовых лимфокинов, так как стимулирующее влияние супернатантов МНК, освобожденных от моноцитов, более выражено в культуре МНК, освобожденных от Т-клеток, чем в культуре МНК, активированной МЛ. Ингибирующее влияние супернатантов МНК в культуре МНК, активированных МЛ, может свидетельствовать в пользу супрессорного воздействия трекрезана на «каскад ИЛ», действующих на начальных этапах иммунного ответа (ИЛ-1, ИЛ-2), т. е. препарат, возможно, тормозит влияние ИЛ-1 на продукцию ИЛ-2, не влияя при этом на продукцию каждого отдельного ИЛ. Можно предположить, что у больных ревматоидным артритом трекрезан усиливает продукцию монокинов (возможно, это ИЛ-1, ИЛ-6) и Т- и В-клеточных ростовых лимфокинов (возможно, это ИЛ-2, ИЛ-4, ИЛ-6, α-интерферон). Активность супернатантов МНК, освобожденных от моноцитов, превышает активность супернатанта МНК, что не исключает влияния трекрезана на взаимодействие ИЛ-1 и ИЛ-2 и у больных ревматоидным артритом. Таким образом, трекрезан, вероятно, стимулирует пролиферацию МНК за счет прямого влияния на В-лимфоциты и усиления продукции ростовых лимфокинов у здоровых доноров и больных артритом и монокинов только у больных.

При тестировании препарата в культурах МНК обращает внимание снижение активности трекрезана в культурах МНК, активированных поликлональными митогенами. Поскольку оценку супернатантов проводили в культурах МНК, активированных МЛ, можно предполагать, что основное влияние на пролиферацию оказывают не минимальные дозы препарата, возможно, остающиеся в супернатантах при их получении, а вырабатываемые клетками медиаторы.

Установлено, что трекрезан угнетает колониюобразующую активность ПСКК, увеличивает количество ядросодержащих клеток и стимулирует пролиферацию МНК, т. е. препарат действует на разных этапах образования лимфоцитов из стволовой кроветворной клетки. Препарат стимулирует дифференцировку и функциональную активность более зрелых лимфоцитов и снижает наработку лимфоидных клеток *de novo*. Выгодной особенностью трекрезана является его усиливающее влияние на функции существующих лимфоцитов, а не на стимуляцию появления новых, функционально незрелых лимфоидных клеток.

Итак, установлено иммуностимулирующее влияние трекрезана *in vivo*: он в 2 раза усиливает гуморальный иммунный ответ. При изучении иммунофармакодинамики препарата показано, что его активность опосредована прямым стимулирующим влиянием на пролиферацию В-лимфоцитов и усилением продукции лимфокинов и монокинов. Различия во влиянии на продукцию цитокинов у доноров и больных ревматоидным артритом объясняются имеющимися нарушениями в продукции и активности медиаторов у больных с данной аутоиммунной патологией [5].

#### Выводы

1. Трекрезан стимулирует *in vivo* гуморальный иммунный ответ у животных, оказывая влияние на стволовые элементы лимфо- и гемопоэза; выраженное стимулирующее влияние препарата на антителогенез сочетается с его противовоспалительными свойствами.

2. Активность трекрезана *in vitro* опосредована

прямым стимулирующим влиянием на пролиферацию В-лимфоцитов и усилением продукции ростстимулирующих лимфокинов и монокинов.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Бейум А. // Лимфоциты: выделение, фракционирование и характеристика.— М., 1980.— С. 9—19.
2. Михеенко Т. В. // Лаб. дело.— 1987.— № 10.— С. 763—766.
3. Колесникова О. П., Кудаева О. Т., Логинов В. А. и др. // Вестн. АМН СССР.
4. Aral S., Yamamoto H., Iton K., Kamagai K. // J. Immunol.— 1983.— Vol. 131, N 2.— P. 651—657.
5. Bruijn J. A., Elven E. H., Nodendoorn P. C. W. et al. // Amer. J. Path.— 1988.— Vol. 130, N 3.— P. 63—641.
6. Combe B. // Rev. rhum Mal. Osteoartic.— 1989.— Vol. 56, N 5.— P. 30—33.
7. Cunningham A. I., Srenberg A. // Immunology.— 1968.— Vol. 15.— P. 559—606.
8. Him B. S., Hui K. M. // J. Immunol.— 1985.— Vol. 135, N 1.— P. 255—260.
9. Till J. E., McCulloch E. A. // Radiat. Res.— 1961.— Vol. 14, N 2.— P. 213—222.

Поступила 11.02.92

#### IMMUNOACTIVE PROPERTIES OF TRECRESAN

V. S. Shirinsky, O. P. Kolesnikova, O. T. Kudayeva, N. V. Semenova, Ye. A. Zhuk, A. N. Mirskova, M. N. Tuzova, T. G. Sukhenko, M. G. Voronkov, V. A. Kozlov

Institute of Clinical Immunology, 14 Yadrinzovskaya St., 630091 Novosibirsk; Institute of Organic Chemistry, 1 Favorovskiy St., 664033 Irkutsk

It was shown that *in vivo* trecrezan possessed strong immunoactive properties: it decreased the spot-forming activity of polypotent stem blood cells, stimulated lympho- and hemopoiesis, antibody formation, possessed steady antiinflammatory activity. It stimulated *in vitro* mononuclear cell proliferation in man due to its direct action on B lymphocytes and increase in lymphokine and monokine production.