

ИММУНОФАРМАКОЛОГИЯ. ПРОТИВОАЛЛЕРГИЧЕСКИЕ СРЕДСТВА

ЦИТОКИНСИНТЕЗИРУЮЩАЯ ФУНКЦИЯ МОНОНУКЛЕАРНЫХ КЛЕТОК КРОВИ ДОНОРОВ ПРИ ВОЗДЕЙСТВИИ ПРОИЗВОДНОГО ИНДОЛИЛ-ТИО-АЛКАНКАРБОНОВОЙ КИСЛОТЫ С СЕЛЕКТИВНЫМИ ИММУНОДЕПРЕССИВНЫМИ СВОЙСТВАМИ

И. А. Гольдина, И. В. Сафронова, К. В. Гайдуль, В. А. Козлов¹

Изучено влияние соединения ВМ-7-02 на продукцию цитокинов в культуре клеток крови доноров. Соединение подавляет продукцию ключевых цитокинов, синтезируемых CD4⁺ Th1 и Th2 клетками: γ — ИФН, ИЛ-2 и ИЛ-4, стимулирует продукцию ФНО- α и ИЛ-6, не изменяя продукцию ИЛ-1 β .

Ключевые слова: соединение ВМ-7-02, цитокины, спонтанная продукция, митоген-стимулированная продукция

ВВЕДЕНИЕ

Скрининг иммуноактивных свойств производных арилгетероалкан-карбоновых кислот, представляющих трис-(2-гидрокси-этил) аммониевые соли производных индолил-3-тиоуксусной кислоты, позволил выявить соединение, обладающее антипролиферативными свойствами в отношении клеток селезенки мышей и низкой токсичностью — соединение ВМ-7-02 [6, 7]. Исследование свойств соединения ВМ-7-02 на экспериментальных моделях Т-зависимой активации В-лимфоцитов, а также изучение клеточного состава и морфометрических показателей лимфоидных органов мышей продемонстрировало уменьшение количества зрелых В-лимфоцитов, площади фолликулов белой пульпы и размеров В-зависимых зон селезенки [7, 8]. Кроме того, на модели хронической РТПХ установлена способность данного соединения изменять баланс Th1/Th2 в сторону преобладания Th1-клеток [5], что свидетельствует о селективных иммунодепрессивных свойствах данного соединения.

Так как цитокиновая сеть является основной сетью регуляторных молекул в иммунной системе, оценка уровня продукции цитокинов клетками иммунной системы — один из важнейших методических приемов при оценке эффективности и направленности действия иммунотропных препаратов [2, 9]. В этой связи было актуальным исследовать влияние изучаемого соединения на продукцию ряда цитокинов, вырабатываемых Т-хелперами 1 и 2 типа, обеспечивающими, соответственно, клеточную и гуморальную составляющие иммунного ответа, а также продуцируемых

клетками моноцитарно-макрофагального ряда и В-лимфоцитами [10].

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Доноры. Кровь условно здоровых лиц из числа штатных доноров была предоставлена Новосибирским центром крови.

Выделение мононуклеарных клеток. Мононуклеарные клетки (МНК) периферической крови доноров выделяли центрифугированием на градиенте плотности фиколла 1,078 г/см³ (Lymphocyte separation medium, MP Biomedicals, LLC, Eschwege, Германия) [4] и в концентрации $2 \cdot 10^6$ мл культивировали в среде RPMI-1640 (ГНЦ вирусологии и биотехнологии “Вектор”, п. Кольцово) содержащей 10 % сыворотки крови человека АВ (IV) (Новосибирский центр крови), 10 мМ Hepes (ICN Biomedicals Inc, Aurora, Ohio, США), $4 \cdot 10^{-5}$ М 2-меркаптоэтанол (L. Oba Feinchemie, Fischamene), 2 Мм L-глутамин (ГНЦ вирусологии и биотехнологии “Вектор”, п. Кольцово), 40 мкг/мл гентамицина (ФГУП НПО “Вирион”).

Стимуляция клеток. При изучении спонтанного и индуцированного синтеза цитокинов в культуральную среду к МНК вносили соединение ВМ-7-02 в конечных концентрациях 30 мкг/мл, 100 мкг/мл и 300 мкг/мл. Синтез ИЛ-1 β индуцировали липополисахаридом *E.coli* 055:B5 (“Sigma”) (LPS) в течение суток, ФНО- α , ИЛ-2 — фитогемагглютинином (“Sigma”) (РНА) в течение суток, ИЛ-4, ИЛ-6 — РНА 48 ч, γ -ИФН — РНА 72 ч в концентрациях, стимулирующих максимальную продукцию каждого из цитокинов (РНА 20 мкг/мл, LPS 50 мкг/мл).

Определение цитокинов. Продукцию цитокинов определяли в супернатанте клеточных культур посред-

¹ Учреждение РАМН НИИКИ СО РАМН, Новосибирск-99, 630099, ул. Ядринцевская, 14.

ством твердофазного варианта метода иммуноферментного анализа [1], с использованием коммерческих тест-систем: “Протеиновый контур” (Санкт-Петербург) — ИЛ-1 β , ФНО- α , ИЛ-4, ИЛ-6; “Цитокин” (Санкт-Петербург) — ИЛ-2 и γ -ИФН.

Статистическую обработку данных проводили при помощи парного критерия Манна — Уитни с использованием программы Statistica 6.0.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Уровни спонтанной продукции цитокинов *in vitro*, определенные в серии предварительных экспериментов, составили: ФНО- α ($147 \pm 33,2$ пкг/мл), ИЛ-2 ($54,9 \pm 3,9$ пкг/мл), ИЛ-4 ($40 \pm 11,3$ пкг/мл), γ -ИФН ($810,9 \pm 41,2$ пкг/мл), ИЛ-1 β ($138,4 \pm 33,8$ пкг/мл), ИЛ-6 (1519 ± 409 пкг/мл). Эти показатели не превышают нормативных значений и согласуются с данными литературы о наличии нестимулированной продукции цитокинов у здоровых людей [3, 11, 12].

При культивировании МНК крови доноров в присутствии различных концентраций соединения ВМ-7-02 достоверных изменений уровней нестимулированной продукции ИЛ-1, γ -ИФН, ИЛ-2 и ИЛ-4 выявлено не было. В то же время, данное соединение в конечной концентрации 100 мкг/мл стимулирует спонтанную продукцию ФНО- α , а в концентрации 300 мкг/мл — спонтанную продукцию ИЛ-6 мононуклеарными клетками периферической крови здоровых лиц (таблица).

Исследование митоген-стимулированной продукции цитокинов продемонстрировало, что данное соединение в концентрации 100 мкг/мл стимулирует

РНА-индуцированную продукцию ФНО- α , а в концентрации 30 мкг/мл и 100 мкг/мл стимулирует РНА-индуцированную продукцию ИЛ-6. Соединение ВМ-7-02 ни в одной из исследованных концентраций не изменяет LPS-стимулированную продукцию ИЛ-1 β . В то же время данное соединение в концентрации 300 мкг/мл подавляет РНА-индуцированную продукцию γ -ИФН, во всех исследованных концентрациях снижает РНА-стимулированную продукцию ИЛ-2, а в концентрации 100 мкг/мл и 300 мкг/мл снижает РНА-индуцированную продукцию ИЛ-4 МНК условно здоровых лиц (таблица).

Таким образом, наблюдаемая нами стимуляция выработки ФНО- α как интактными, так и митоген-стимулированными МНК при совместном культивировании клеток и соединения ВМ-7-02 свидетельствует об активации под действием данного соединения клеток моноцитарно-макрофагального ряда. Учитывая данные литературы о взаиморегулирующих воздействиях в системе цитокинов [9], можно предположить как прямое воздействие соединения ВМ-7-02 на продукцию ИЛ-6, так и опосредованное — через стимуляцию синтеза ФНО- α , который является активным индуктором продукции ИЛ-6, который, в свою очередь, аутокринно ингибирует продукцию ИЛ-1. Об этом свидетельствует отсутствие изменений в продукции под влиянием изучаемого соединения.

Выявленное нами подавление митоген-индуцированной продукции ИЛ-2 и γ -ИФН, основными продуцентами которых являются активированные Т-хелперы 1 типа, а также митоген-стимулированной продукции ИЛ-4, продуцируемого Т-хелперами 2 типа, свидетельствует о подавлении функциональной актив-

Продукция цитокинов в культуре мононуклеарных клеток крови доноров при воздействии соединения ВМ-7-02 (в пкг/мл, $M \pm m$)

Цитокины	Концентрация ВМ-7-02, мкг/мл				
	0	30	100	300	
ИЛ-1 β , $n = 9$	спонтанная продукция	$176,6 \pm 22,5$	198 ± 24	171 ± 15	$201,6 \pm 28$
	митоген-стимулированная продукция	$189,3 \pm 24,4$	$229 \pm 32,3$	$234 \pm 39,3$	$264 \pm 28,3$
ФНО- α , $n = 9$	спонтанная продукция	$116,4 \pm 20,2$	$160,5 \pm 29,1$	$283 \pm 69^*$	$220,3 \pm 74$
	митоген-стимулированная продукция	$1209 \pm 238^{**}$	$1525 \pm 272,5$	$1777 \pm 275,4^*$	1167 ± 295
γ -ИФН, $n = 6$	спонтанная продукция	$810,9 \pm 41,2$	$892,8 \pm 39,9$	$831,9 \pm 50,4$	$728,8 \pm 48,2$
	митоген-стимулированная продукция	$1604 \pm 176,1^{**}$	$1563,3 \pm 129,5$	$1141,8 \pm 170,3$	$667,4 \pm 76,3^{**}$
ИЛ-2, $n = 6$	спонтанная продукция	$54,9 \pm 3,9$	$49,5 \pm 12,8$	$28,2 \pm 11,9$	$21,9 \pm 11,6$
	митоген-стимулированная продукция	$95,6 \pm 10,5^{**}$	$51,3 \pm 11,4^*$	$17,2 \pm 4,5^{**}$	$6,0 \pm 2,3^{**}$
ИЛ-6, $n = 5$	спонтанная продукция	1519 ± 409	1948 ± 454	2322 ± 397	$2399 \pm 356^*$
	митоген-стимулированная продукция	$3258 \pm 72,8^{**}$	$3443 \pm 37,3^*$	$3623,3 \pm 48^{**}$	$3365 \pm 65,9$
ИЛ-4, $n = 8$	спонтанная продукция	$60,5 \pm 10,3$	$58 \pm 5,8$	$44,6 \pm 5,2$	$40,7 \pm 5,4$
	митоген-стимулированная продукция	$160,4 \pm 55,1^*$	$105 \pm 22,7$	$69,9 \pm 6,6^*$	$60,3 \pm 9^*$

Примечание. Различия достоверны с контрольной группой (U-критерий Манна — Уитни) при: * — $p < 0,05$, ** — $p < 0,01$.

ности последних. Эти данные сопоставимы с результатами [7] о подавлении и ConA- и PWM- стимулированной пролиферации клеток селезенки мышей под влиянием изучаемого соединения.

ВЫВОД

Соединение BM-7-02 оказывает разнонаправленное воздействие на функциональную активность лимфоцитов и клеток системы мононуклеарных фагоцитов периферической крови условно здоровых лиц.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Антитела. Методы*, Д. Кэтти (ред.), кн. 1 – 2, Мир, Москва (1991).
2. Н. М. Бережная, *Цитокины и воспаление*, **6**(2), 26 – 33 (2007).
3. В. А. Зурочка, И. И. Долгушин, А. С. Симбирцев, *Цитокины и воспаление*, **6**(1), 31 – 35 (2007).
4. Дж. Клаус, *Лимфоциты. Методы*, Медицина, Москва (1990).
5. О. П. Колесникова, О. Т. Кудаева, Е. В. Ненашева и др., *Бюлл. СО РАМН*, **124**(2), 14 – 18 (2007).
6. О. П. Колесникова, О. Т. Кудаева, Т. Г. Сухенко и др., ВИ-ЛИМ, Новосибирск (2008), сс. 29 – 36.
7. В. Л. Лимонов, А. В. Шурлыгина, М. В. Робинсон и др. *Бюлл. СО РАМН*, **115**(1), 70 – 73 (2005).
8. В. Л. Лимонов, А. В. Шурлыгина, М. В. Робинсон и др., *Бюлл. СО РАМН*, **116**(2), 55 – 58 (2005).
9. Р. М. Хаитов, Б. В. Пинегин, *Иммунология*, **4**, 4 – 7 (2001).
10. А. А. Ярилин, *Иммунология*, **5**, 7 – 14 (1997).
11. J. Jason, L. Archibald, L. C. McDonald, et al., *Clin. Diagn. Lab. Immunol.*, **6**(1), 73 – 78 (1999).
12. J. Jason, L. K. Archibald, O. C. Nwanyanwu, et al., *Clin. Exp. Immunol.*, **126**(3), 466 – 473 (2001).

Поступила 29.04.09

CYTOKINE SYNTHESIS FUNCTION OF HEALTHY VOLUNTEER'S BLOOD MONONUCLEAR CELLS UNDER THE INFLUENCE OF AN INDOLYL-THIO-ALKANECARBOXYLIC ACID DERIVATIVE WITH SELECTIVE IMMUNODEPRESSANT PROPERTIES

I. A. Gol'dina, I. V. Safronova, K. V. Gaidul', and V. A. Kozlov

Scientific Research Institute of Clinical Immunology, Siberian Branch of Russian Academy of Medical Sciences, ul. Yadrintsevskaya 14, Novosibirsk, 630099, Russia

The influence of BM-7-02 compound on the production of cytokines in the culture of healthy volunteers' blood cells. This compound suppresses the production of main cytokines (γ -IFN, IL-2 and IL-4) synthesized by CD4⁺ Th1 and Th2 cells, stimulates the production of TNF- α and IL-6, and does not change the production of IL-1 β .

Key words: BM-7-02 compound, cytokines, spontaneous production, mitogen-stimulated production