

# ИЗУЧЕНИЕ ИММУНОТРОПНОСТИ ПОЛИФУНКЦИОНАЛЬНЫХ ВОДОРАСТВОРИМЫХ АНТИОКСИДАНТОВ *IN VITRO*

Клепикова С.Ю.<sup>1</sup>, Колесникова О.П.<sup>2</sup>, Просенко А.Е.<sup>3</sup>,  
Кандалинцева Н.В.<sup>3</sup>

<sup>1</sup> ГОУ ВПО «Новосибирский государственный медицинский университет Федерального агентства по здравоохранению и социальному развитию», г. Новосибирск

<sup>2</sup> ГУ НИИ клинической иммунологии СО РАМН, г. Новосибирск

<sup>3</sup> НИИ химии антиоксидантов НГПУ, г. Новосибирск

**Резюме.** Проведено исследование иммуностропных свойств соединений  $\omega$ -(3,5-ди-метил-4-гидроксифенил)пропилтиосульфат натрия (Ф-11-7) и  $\omega$ -(3,5-ди-трет-бутил-4-гидроксифенил)пропилтиосульфат натрия (Ф-17-7) на спонтанную и митоген-стимулированную пролиферацию клеток селезенки в культуре *in vitro*. Обнаружено, что соединения Ф-11-7 и Ф-17-7 дозозависимо подавляют пролиферацию интактных спленоцитов.

**Ключевые слова:** водорастворимые антиоксиданты, иммуностропные препараты.

*Klepikova S. Yu., Kolesnikova O. P., Prossenko A. Ye., Kandalintceva N. V.*

## **IN VITRO IMMUNOTROPICITY STUDIES OF POLYFUNCTIONAL WATER-SOLUBLE ANTIOXIDANTS**

**Abstract.** A study of immunotropic properties of  $\omega$ -(3,5-dimethyl-4-hydroxyphenyl) propylthiosulfonate, sodium salt (F-11-7), and  $\omega$ -(3,5-di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl) propylthiosulfonate, sodium salt (F-17-7) was carried out, employing an in vitro model of spontaneous and mitogen-stimulated proliferation of cultured spleen cells. It is revealed, that the F-11-7 and F-17-7 compounds are able to suppress proliferation of intact splenocytes in a dose-dependent manner. (*Med. Immunol.*, 2008, vol. 10, N 2-3, pp 269-272)

## Введение

В настоящее время активированные кислородные метаболиты (АКМ) и окислительные реакции с их участием рассматриваются как универсальный механизм регуляции клеточной пролиферации и апоптоза, в том числе в клетках иммунной системы [2]. Актуальной проблемой является поиск иммуноактивных соединений с относительно селективным механизмом действия, который сдерживается отсутствием адекватных моделей. Аналогичные проблемы существуют для изучения антиоксидантных свойств препаратов [3]. В единичных работах предпринимаются шаги для разработки системы оценки иммуностропных пре-

паратов на основе анализа взаимосвязи иммунной и антиоксидантной систем [6]. Нами ранее в модельных системах тестирования, основанных на окислении этилолеата в водно-эмульсионной среде, образовании малонового диальдегида при инкубации выделенных липопротеинов низкой плотности с ионами металлов переменной валентности и дыхательном «взрыве» гранулоцитов, стимулированном зимозаном, показана высокая антиокислительная активность соединений Ф-17-7 и Ф-11-7 [5]. Данные соединения представляют собой новые водорастворимые антиоксиданты, содержащие в своей структуре два активных фрагмента — стерически затрудненный фенольный и тиосульфатный [4].

Целью настоящей работы является исследование иммуноактивных свойств соединений в тестах спонтанной и митоген-стимулированной пролиферации клеток селезенки в культуре *in vitro*.

## Адрес для переписки:

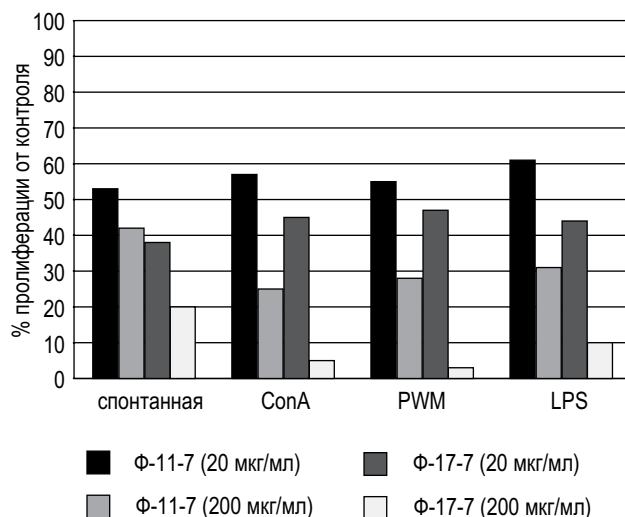
Клепикова Софья Юрьевна  
630064, г. Новосибирск, пр. Карла Маркса, 14, к. 37.  
Тел.: 8 (913) 904-15-78.  
E-mail: klepikova.sofya@mail.ru

## Материалы и методы

В работе использовали здоровых половозрелых животных – самцов мышей гибридов (СВАхС57BL/6)F1 (СВF1), 8-10 недельного возраста, массой тела 18-20 г, полученных из питомника («Рассвет», г. Томск). Животные содержались в виварии в одинаковых условиях: в стандартных пластиковых клетках с мелкой древесной стружкой (не более 10 особей), на стандартном рационе, при естественном освещении. Клетки селезенки мышей СВF1 культивировали в круглодонных планшетах для иммунологических реакций («Linbro») при +37°C в атмосфере 5% CO<sub>2</sub> и 95% воздуха. Абсолютное количество клеток, вносимых в лунку, составляло 200 000. Клетки стимулировали митогенами конканавалином А (ConA, «Sigma») или митогеном лаконоса (PWM, «Sigma»). Концентрации митогенов подбирали предварительным титрованием и использовали в оптимальной дозе, что составило для ConA 2 мкг/мл, а для PWM 1 мкг/мл. Соединения Ф-17-7 и Ф-11-7 в трех дозах вносили в лунки одновременно с митогенами. Пролиферативную активность клеток оценивали по включению НЗ-тимидина в ДНК делящихся клеток. Метку вносили за 16 часов до конца культивирования по 1 мКи в каждую лунку планшета. По окончании инкубации клетки собирали на стеклянноволокнистые фильтры («Flow Lab») с помощью аппарата Harvester («Titertek»). Радиоактивность подсчитывали в жидкостном сцинтилляционном счетчике «Delta» (США).

## Результаты и обсуждение

Важную роль в развитии иммуносупрессии играет усиление свободнорадикальных реакции и процессов перекисного окисления липидов (ПОЛ) клеточных мембран. Активация ПОЛ приводит к изменению структуры их двойного фосфолипидного слоя, конформации и взаимного расположения мембранных рецепторов, нарушению функции транспортных и канальных белков, инактивации мембраносвязанных ферментов. АКМ, являясь продуктами ПОЛ, дезорганизуют структуру мембран различных клеток, в первую очередь гепатоцитов, эритроцитов и иммунцитов [7]. Образование и расходование АКМ находится под контролем многоступенчатой антиоксидантной системы, а сами антиоксиданты являются универсальными мембраностабилизаторами. Разветвленная сеть антиоксидантов препятствует каскадному радикалообразованию в иммунокомпетентных клетках. При этом функциональные возможности иммунокомпетентных клеток определяются их внутриклеточными метаболическими процессами, среди которых ключевую роль играют процессы свободнорадикального окисления и образования АКМ [2].



**Рисунок 1.** Влияние водорастворимых антиоксидантов Ф-11-7 и Ф-17-7 на спонтанную и митоген-стимулированную пролиферацию клеток селезенки *in vitro*

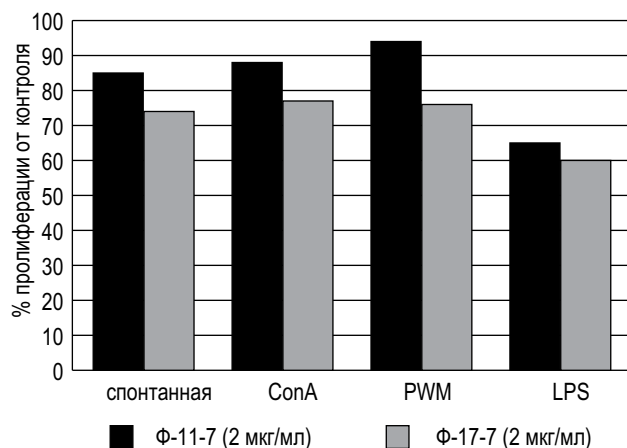
Нами ранее показано, что добавление в культуры мононуклеарных клеток (МНК) периферической крови больных хроническим гепатитом С (ХГС) соединения Ф-17-7 в дозе 0,2 мкг/мл приводило к усилению пролиферативной активности МНК у 75% больных ХГС [8].

Возможность иммуотропных препаратов регулировать пролиферативную активность иммунокомпетентных клеток исследовали в присутствии соединений Ф-17-7, Ф-11-7 в дозах 2 мкг/мл, 20 мкг/мл и 200 мкг/мл на спонтанную и стимулированную митогенами ConA, PWM, LPS пролиферацию Т- и В- клеток селезенки интактных мышей. Полученные результаты представлены на рисунке 1.

Установили, что соединение Ф-11-7 в дозе 20 мкг/мл дозозависимо подавляет спонтанную пролиферацию на 47%, а ConA, PWM и LPS-стимулированную пролиферацию клеток селезенки соответственно на 43%, 45% и 39%, а в дозе 200 мкг/мл – спонтанную на 58%, ConA – на 75%, PWM – на 72% и LPS – на 69%.

Соединение Ф-17-7 в двух дозах подавляет спонтанную пролиферацию соответственно на 62% и 80%. В дозе 20 мкг/мл ингибция митоген-индуцированной пролиферации равна: ConA – на 55%, PWM – на 53%, LPS – на 56%. При этом подавление ConA, PWM и LPS-стимулированной пролиферации клеток селезенки в дозе 200 мкг/мл сводится практически до нуля.

Низкие дозы соединений Ф-11-7 и Ф-17-7, по всей видимости, угнетают функциональную активность иммунокомпетентных клеток, снижая их способность адекватно отвечать на стимуляцию митогеном. Так, соединения Ф-11-7 и Ф-17-7 в дозе 2 мкг/мл не проявляют значи-



**Рисунок 2. Влияние водорастворимых антиоксидантов Ф-11-7 и Ф-17-7 на спонтанную и митоген-стимулированную пролиферацию клеток селезенки *in vitro***

тельного эффекта на ингибицию спонтанной и митоген-индуцированной пролиферации.

При обследовании крови больных ревматоидным артритом было обнаружено, что соединения Ф-11-7 и Ф-17-7 в дозе 200 мкг/мл резко подавляли спонтанную и митоген-стимулированную пролиферацию лимфоцитов периферической крови. Соединение Ф-11-7 ингибировало спонтанную — на 77%, ConA — на 96%, PWM — на 57%, соединение Ф-17-7 соответственно спонтанную — на 91%, ConA — на 98%, PWM — на 98%. Полученные результаты совпадают с данными предыдущих опытов, проведенных на клетках селезенки intactных мышей *in vitro*.

Подавление Т- и В-клеточной пролиферации возможно связано с удалением супероксидного радикала из среды культивирования водорастворимыми антиоксидантами Ф-11-7 и Ф-17-7. Известно [1], что удаление супероксидного радикала из среды культивирования с помощью СОД приводит к снижению уровня стимулированной ConA пролиферации мононуклеарных клеток периферической крови человека и спленоцитов мышей [1]. Можно предположить, что исследуемые антиоксиданты действуют подобно СОД.

Таким образом, нами выявлено ингибирующее влияние соединений Ф-11-7 и Ф-17-7 в дозах 20 мкг/мл и 200 мкг/мл на пролиферативную активность иммунокомпетентных клеток *in vitro* и в дозе 200 мкг/мл на пролиферацию лимфоцитов периферической крови человека, больного ревматоидным артритом.

Данные об иммуноактивных свойствах *in vitro* и *in vivo* антиоксидантов многочисленны и достаточно противоречивы. По данным [10], лимфоциты крови, инкубированные *in vitro* с  $1 \times 10^{-9}$  М β-каротина и стимулированные ConA, проявляли усиление пролиферации, а по данным [13], β-каротин в дозе от  $1 \times 10^{-6}$  до  $1 \times 10^{-5}$  М — ин-

гибирует пролиферацию лимфоцитов *in vitro*. Стимуляторная активность β-каротина на лимфоцитарный бластогенез показана на разных видах животных. В/м введение от 20 до 40 мг β-каротина зрелым [11] и новорожденным морским свинкам усиливает пролиферацию лимфоцитов крови. Аналогично, увеличение ConA- и LPS-индуцированной пролиферации лимфоцитов наблюдали у крыс, содержащихся на диете с 2% содержанием β-каротина по весу и аналогом β-каротина [9]. В то же время показано, что ресвератрол дозозависимо подавляет ConA и LPS-индуцированную пролиферацию спленоцитов [12], но в низких дозах (0,75–6 мкмоль/л) приводит к ее усилению [14].

## Список литературы

1. Вольский Н.Н., Кашлакова Н.В., Козлов В.А. Влияние супероксидного радикала на пролиферацию лимфоцитов, стимулированную митогеном // Цитология. — 1988. — № 7. — С. 899-901.
2. Зенков Н.К., Ланкин В.З., Меньшикова Е.Б. Окислительный стресс. — М.: Наука, 2001. — 315 с.
3. Зенков Н.К., Кандалинцева Н.В., Ланкин В.З., Меньшикова Е.Б., Просенко А.Е. Фенольные биоантиоксиданты. — Новосибирск: СО РАМН, 2003. — С. 7-11.
4. Кандалинцева Н.В., Дюбченко О.И., Клепикова С.Ю., Терах Е.И., Просенко А.Е. Синтез полифункциональных водорастворимых антиоксидантов на основе ω-(4-оксиарил) галогеналканов // Тез. докл. III Международной конф. «Современные проблемы органической химии». — Новосибирск: СО РАН, 2001. — С. 95.
5. Просенко А.Е., Клепикова С.Ю., Кандалинцева Н.В., Дюбченко О.И., Зенков Н.К. Синтез и исследование антиоксидантных свойств новых водорастворимых серосодержащих фенольных соединений // Бюллетень СО РАМН. — 2001. — № 1. — С. 114-119.
6. Тутельян А.В. Разработка системы оценки иммунотропных препаратов природного и синтетического происхождения на основе анализа взаимосвязи иммунной и антиоксидантной защиты // Аллергология и иммунология. — 2004. — Т. 5, № 2. — С. 289-299.
7. Утешев Б.С., Быстрова Н.А., Бровкина И.Л., Авакян А.Р. Иммуномодулирующее и антиоксидантное действие витаминов А и Е при воздушном и иммерсионном охлаждении // Экспериментальная и клиническая фармакология. — 2001. — Т. 64, № 1. — С. 60-63.
8. Фридлянд И.Ф., Просенко А.Е., Клепикова С.Ю., Кандалинцева Н.В., Леплина О.Ю., Тихонова М.А., Останин А.А., Черных Е.Р. Влияние антиоксидантов на функциональную активность

моноклеарных клеток периферической крови больных вирусным гепатитом С // Мед. иммунология. — 2001. — Т. 3, № 2. — С. 243.

9. Bendich A., Shapiro S.S. Effect of  $\beta$ -carotene and canthaxanthin on the immune responses of the rat // J. Nutr. — 1986. — N 11. — P. 2254-2262.

10. Daniel L.R., Chew B.P., Tanaka T.S., Tjoelker L.W. In vitro effects of  $\beta$ -carotene and vitamin A on peripheral blood mononuclear cell proliferation // J. Dairy Sci. — 1990. — N 3. — P. 74-911.

11. Hoskinson C.D., Chew B.P., Wong T.S. Effects of  $\beta$ -carotene (BC) and vitamin A (VA) on mitogen-induced lymphocyte proliferation in the pig in vivo // Fed. Am. SOC. Exp. Biol. J. — 1989. — N 3. — P. 663.

12. Sharma S., Chopra K., Kulkarni S.K., Agrewala J.N. Resveratrol and curcumin suppress immune

response through CD28/CTLA-4 and CD80 co-stimulatory pathway // Clin. Exp. Immunol. — 2006. — N 5. — P. 147, 155-163.

13. Tjoelker L.W., Chew B.P., Tanaka T.S., Danie L.R. Bovine vitamin A and  $\beta$ -carotene intake and lactational status. Responsiveness of mitogen-stimulated peripheral blood lymphocytes to vitamin A and  $\beta$ -carotene challenge in vitro // J. Dairy Sci. — 1988. — N 1. — P. 71, 3120-3127.

14. Wen-Liang Z., Wu Qing-Li, LI Xiao-Yu, Wei-Min Z., Zou Jian-Ping. Low dose of resveratrol enhanced immune response of mice // Acta Pharmacol. Sin. — 2002. — N 10. — P. 893-897.

*поступила в редакцию 25.05.2007*

*отправлена на доработку 10.06.2007*

*принята к печати 04.02.2008*