

Митогенные и лимфотоксические эффекты группоспецифических в системе АВ0 полисахаридов животного происхождения

РНПЦ гематологии и трансфузиологии, РУП “МБИ” концерна “Белбиофарм”

В экспериментах *in vitro* показано, что группоспецифические в системе АВ0 полисахариды животного происхождения, выделяемые из слизистых оболочек свиней и лошадей, в диапазоне исследованных доз не оказывают токсического действия на лимфоциты, а также не обладают митогенной активностью (МТТ-тест) по отношению к нормальным и активированным к пролиферации мононуклеарам периферической крови человека.

Ключевые слова: иммуномодулирующие фармсредства, группоспецифические (в системе АВ0) полисахариды животного происхождения, “Фруглюмин А”, “Фруглюмин В”, лимфоциты человека, митогенная активность, лимфотоксическое действие

Бурное развитие антибиотикотерапии на некоторое время необоснованно снизило интерес к роли неспецифических факторов защиты организма от микробной инвазии и других патогенных влияний. Между тем практика показывает, что при низком уровне активности иммунной системы, например у новорожденных, лиц преклонного возраста, ослабленных людей (истощение, перегрузка, переохлаждение и др.), результативность применения противомикробных средств зачастую невелика, в силу чего для достижения лечебного эффекта становится необходимым использование более жестких схем терапии в сочетании со средствами, повышающими как общую, так и иммунологическую резистентность ?6?.

Учитывая широкое распространение заболеваний, в патогенезе которых существенную роль играют нарушения реакций иммунного гомеостаза, чрезвычайно актуальной задачей является разработка эффективных иммуномодуляторов, способных, в зависимости от конкретной ситуации, оказать корригирующее влияние на направленность сложных механизмов реализации молекулярно-клеточных взаимодействий различных элементов этой системы. Ее актуальность обусловлена и тем обстоятельством, что арсенал используемых в клинической практике препаратов, проявляющих направленное иммуномодулирующее действие, крайне недостаточен (в основном интерлейкины и интерферон), что побуждает исследователей к совершенствованию существующих и разработке новых иммунокорректоров ?5?.

Методология изучения иммуномодулирующих свойств создаваемых фармакологических средств в качестве неперемного условия включает оценку их влияния на Т-и В-клеточный иммунитет, в том числе на фоне влияния поликлональных активаторов лимфоцитов человека, применение оптимальных и субоптимальных концентраций которых позволяет оценить эффективность препаратов при различной по степени выраженности напряженности иммунного ответа. При этом, обязательным этапом в оценке специфической (иммуномодулирующей) активности является сопоставление митогенного и лимфотоксического действия препарата в отношении лимфоцитов периферической крови, поскольку, с одной стороны, подобное исследование является элементом

установления общетоксических свойств разрабатываемых соединений, с другой – позволяет установить, хотя и опосредованно, возможную направленность их действия в отношении изменения функциональной активности клеток иммунной системы ?2,3?.

Цель работы – изучить лимфотоксическое действие, а также влияние на пролиферативную активность лимфоцитов человека группоспецифических (в системе АВ0) полисахаридов животного происхождения, являющихся субстанциями для разрабатываемых иммуномодулирующих средств – “Фруглюмин А” и “Фруглюмин В”.

Материал и методы

Группоспецифические полисахариды (П) получали по оригинальной технологии из слизистых оболочек желудков свиней (ПА) и лошадей (ПВ) путем ферментативного гидролиза ткани в течение 1-2 суток при заданном температурном режиме, последующего многократного осаждения этиловым спиртом, контроля серологической активности и сублимированием ?1?.

Лимфотоксическое действие ПА и ПВ (со специфической активностью не ниже 0,01) на мононуклеары периферической крови (МПК) человека *in vitro* изучали в специальном тесте ?4? с некоторой модификацией. МПК периферической крови здоровых доноров (стабилизатор – гепарин, 20 ед/мл, РУП “Белмедпрепараты”) выделяли по методу ?7? на градиенте Ficoll-Нураque (“Pharmacia”, Швеция) плотностью 1,077 г/см³ в течение 30 минут, после чего клетки дважды отмывали в среде RPMI-1640 с 2% АВ (IV) сыворотки человека, 2 мМ L-глутамина, 100 ед/мл пенициллина и 100 мкг/мл стрептомицина. Выделенные клетки ресуспендировали до конечного содержания 1 ? 10⁶/мл в бессывороточной культуральной среде RPMI-1640, содержащей 2мМ L-глутамин, 100 Ед/мл пенициллина и 100 мкг/мл стрептомицина, и культивировали в течение 20 часов при 37о С во влажной атмосфере с 5% СО₂ в 96-луночных круглодонных микропланшетах в присутствии исследуемых полисахаридов (ПА, ПВ) или препарата-аналога по иммуномодулирующим свойствам – натрия нуклеината (НН, РУП “Белмедпрепараты”), вносимых в конечных концентрациях 0,1; 0,5; 1; 2,5 и 5 мг/мл. Контролем служили МПК, культивируемые без препаратов. Каждый вариант ставили в 3 повторах. После окончания инкубации микроскопически оценивали жизнеспособность клеток (ЖСП) по исключению трипанового синего, специфически окрашивающего мертвые клетки. За 100% принимали количество живых клеток, культивированных в контроле.

Митогенную активность исследуемых препаратов изучали на МПК доноров крови в спонтанном (прямом) и костимуляторном пролиферативных тестах МТТ-методом. Для оценки прямой митогенной активности МПК здоровых доноров в двукратной концентрации 2 ? 10⁶/мл в объеме 100 мкл вносили в лунки плоскодонных микропланшет в среде RPMI-1640, содержащей 10% АВ (IV) сыворотки и антибиотики (пенициллин 100 ед./мл, стрептомицин 100 мкг/мл). Одновременно добавляли группоспецифические полисахариды (ПА, ПВ) или НН, конечные концентрации – 0,1; 0,5; 1 и 2,5 мг/мл. Контролем служили постановки без внесения препаратов. Через 72 часа инкубации при 37о С во влажной атмосфере с 5% СО₂ в культуры добавляли 10 мкл на лунку 3-?4, 5-диметилтиазол-2-ил?-2, 5-дифенил тетразолиум бромид (МТТ, “Sigma”, США; 5 мкг/мл 0,9 % раствора натрия хлорида, РУП “Белмедпрепараты”). После 4-часовой инкубации в тех же условиях и удаления супернатанта в каждую лунку добавляли по 150 мкл диметилсульфоксида (ДМСО, “Sigma”, США). Клетки ресуспендировали и затем измеряли оптическую плотность на

многоканальном спектрофотометре для микропланшет Reader Microelisa System (Finland) при длине волны 540 нм. Культуры клеток ставили в 5 повторах.

Иммуномодулирующее действие ПА, ПВ и НН оценивали по индексу стимуляции реакции пролиферации МПК, который рассчитывался по формуле:

$$ИС = \text{опыт}/\text{контроль},$$

где опыт – оптическая плотность клеток в присутствии исследуемого препарата, контроль – оптическая плотность клеток без препарата.

Влияние исследуемых препаратов на пролиферативную активность лимфоцитов человека, вызванную ФГА, являющимся поликлональным Т-клеточным активатором, оценивали на следующей модели клеточных культур. МПК в двукратной концентрации 2×10^6 /мл вносили в объеме 100 мкл в лунки плоскодонных микропланшет в среде RPMI-1640, содержащей 10% сыворотки АВ (IV) и антибиотики (пенициллин 100 ед./мл, стрептомицин 100 мкг/мл). Одновременно с ПА, ПВ и НН в культуры вносили ФГА в субоптимальной (1 мкг/мл) концентрации. Для оценки костимулирующего действия исследуемых препаратов использовали МТТ-тест в постановке, описанной выше. Контрольные варианты включали МПК, культивированные только в присутствии ФГА.

Индекс стимуляции реакции пролиферации МПК рассчитывали по формуле:

$$ИС = \text{опыт}/\text{контроль},$$

где опыт – оптическая плотность клеток в присутствии исследуемых препаратов и ФГА, а контроль – оптическая плотность клеток, активированных лектином.

Результаты и обсуждение

Как следует из данных, приведенных в таблице 1, при 20-часовой инкубации МПК в присутствии группоспецифических полисахаридов А и В, равно как и препарата сравнения, вносимых в исследуемом диапазоне концентраций (0,1 – 5 мг/мл), не происходит снижения количества живых клеток. Более того, для большинства исследуемых концентраций ПА, ПВ и НН сохранность клеток в процессе культивирования была выше (для ПВ в конечной концентрации 5 мг/мл – статистически значимо; $P < 0,01$), чем при культивировании интактных лимфоцитов. Данное обстоятельство является дополнительным подтверждением токсикологической безвредности исследуемых соединений и, что особенно важно, выявляемый эффект проявляется в расчетном диапазоне среднесуточных и курсовых терапевтических доз, используемых при разработке готовых лекарственных форм иммуномодулирующих средств – “Фруглюмина А” и “Фруглюмина В”.

Таблица 1

Оценка лимфотоксического действия группоспецифических полисахаридов А и В на МПК человека *in vitro*

Исследуемое вещество	ЖСП (в %) при культивировании в присутствии препаратов (мг/мл)					
	0	0,1	0,5	1,0	2,5	5,0
ПА	100,0±0,0	100,1±13,4	102,1±2,5	95,4±7,7	96,9±5,8	111,0±1,6*, **
ПВ		102,3±3,0	99,5±1,5	116,1±11,0	109,0±9,6	108,7±11,3
НН		102,8±6,9	116,3±6,7	100,1±11,5	108,9±7,9	102,1±3,0

Примечание: * и ** – достоверность отличий по отношению к контрольной (без препаратов) серии эксперимента и постановке с внесением в культуральную среду натрия нуклеината, соответственно, при уровне значимости отличий $P < 0,05$.

Результаты экспериментов по изучению митогенной активности ПА и ПВ (диапазон концентраций: 0,1 – 2,5 мг/мл) в прямом пролиферативном тесте приведены в таблице 2.

Как следует из полученных данных, ПА и ПВ, взятые в максимальной концентрации (2,5 мг/мл), обладали однонаправленным с нуклеинатом натрия действием на пролиферативную активность МПК, выражавшемся в статистически значимом снижении индекса их стимуляции ($0,77 \pm 0,09$; $0,71 \pm 0,1$ и $0,79 \pm 0,06$, соответственно) относительно его уровня у интактных клеток. С уменьшением концентрации до 1 мг/мл данный эффект у ПВ и НН ослабевал, сохраняя достоверность отличий лишь для субстанции “Фруглюмина А” ($0,75 \pm 0,06$; $P < 0,001$). Более низкие концентрации исследуемых веществ (0,1-0,5 мг/мл) практически не обладали способностью усиливать или подавлять пролиферативную активность МПК *in vitro*. Аналогичные закономерности выявлены и для контрольного препарата с той лишь разницей, что степень ингибиции пролиферативной активности в постановках с натрия нуклеинатом была менее выражена.

Таблица 2

Прямое митогенное действие группоспецифических полисахаридов А и В в культуре МПК человека (N=5)

Исследуемое вещество	ИС при культивировании в присутствии препаратов (мг/мл)				
	0	0,1	0,5	1,0	2,5
ПА	$1,0 \pm 0,0$	$1,08 \pm 0,09$	$0,87 \pm 0,07$	$0,75 \pm 0,06^{***}$	$0,77 \pm 0,09^*$
ПВ		$1,06 \pm 0,14$	$1,12 \pm 0,11$	$0,78 \pm 0,12$	$0,71 \pm 0,1^{**}$
НН		$0,89 \pm 0,12$	$1,01 \pm 0,16$	$0,84 \pm 0,08$	$0,79 \pm 0,06^{**}$

Примечание: *, ** и *** – достоверность отличий по отношению к индексу стимуляции МПК без препаратов при уровне значимости $P < 0,05$; $P < 0,01$ и $P < 0,001$, соответственно.

Далее нами была изучена костимуляторная пролифераторная активность исследуемых полисахаридных веществ в культуре МПК в присутствии фитогемагглютина, являющегося мощным универсальным активатором Т-лимфоцитов человека. Результаты данной серии экспериментов представлены в таблице 3. В этих постановках была использована субоптимальная (1 мкг/мл) концентрация ФГА, так как на фоне активации лимфоцитов оптимальной дозой данного лектина (10 мкг/мл) дополнительное внесение исследуемых препаратов полисахаридов в исследуемых концентрациях заведомо не окажет стимулирующего или подавляющего действия на пролиферацию клеток.

Таблица 3

Влияние группоспецифических полисахаридов А и В на пролиферацию лимфоидных клеток, стимулированных фитогемагглютинином в субоптимальной (1 мкг/мл) концентрации (N=5)

Исследуемое вещество	ИС при культивировании в присутствии препаратов (мг/мл) и ФГА				
	0	0,1	0,5	1,0	2,5
ПА	$1,0 \pm 0,0$	$0,99 \pm 0,02$	$0,76 \pm 0,07^{**}$	$0,85 \pm 0,06^*$	$0,62 \pm 0,06^{***}$
ПВ		$1,14 \pm 0,14$	$0,88 \pm 0,05^*$	$1,02 \pm 0,04$	$0,68 \pm 0,09^{**}$
НН		$1,03 \pm 0,03$	$0,97 \pm 0,03$	$0,99 \pm 0,06$	$0,89 \pm 0,05^*$

Примечание: *, ** и *** – достоверность отличий по отношению к индексу стимуляции МПК 1 мкг/мл ФГА (без препаратов) при уровне значимости $P < 0,05$; $P < 0,01$ и $P < 0,001$; ^ – достоверность отличий по отношению к индексу стимуляции 1 мкг/мл ФГА МПК здоровых доноров на фоне натрия нуклеината при уровне значимости $P < 0,01$;

Оказалось, что внесение ПА, ПВ и препарата сравнения в концентрации 0,1 мг/мл не оказывало влияния на пролиферативную активность ФГА-стимулированных лимфоцитов. Субстанции “Фруглюмина А” (в концентрациях 0,5 и 1,0 мг/мл) и “Фруглюмин В” (в концентрации 0,5 мг/мл) вызывали статистически значимое ослабление пролиферации МПК в ответ на активацию лектином, в то время как НН в аналогичных дозировках не обладал способностью изменять пролиферативную активность клеток-мишеней. Максимальные исследованные (2,5 мг/мл) концентрации группоспецифических полисахаридов оказывали значительное (на 38% и 32%, соответственно) подавляющее действие на пролиферацию клеток (0,62±0,06 и 0,68±0,09 при уровнях значимости отличий $P < 0,01$ и $P < 0,001$), тогда как для натрия нуклеината также наблюдалось некоторое снижение индекса стимуляции, но оно, имея статистически значимый уровень отличий ($P < 0,05$), не превышало 11%.

При сравнении изучаемых препаратов между собой и с натрия нуклеинатом, следует отметить, что ингибирующий эффект ПА на пролиферацию *in vitro* лимфоидных клеток человека, стимулированных ФГА, в наших постановках был не только выражен сильнее в сравнении с таковым у ПВ, но и существенно ($P < 0,05$) превышал эффекты аналогичных концентраций препарата сравнения.

Таким образом, используемые в разработке лекарственных форм иммуномодулирующих препаратов группоспецифические (в системе АВ0) полисахариды А и В, выделяемые из слизистых оболочек свиней и лошадей, в диапазоне расчетных суточных терапевтических дозировок не обладают токсическим действием по отношению к лимфоцитам, а также митогенной активностью (по результатам МТТ-теста) к нормальным и активированным к пролиферации мононуклеарам периферической крови человека. Подобное сочетание свойств может указывать на наличие у исследуемых веществ способности к оказанию специфических иммуносупрессорных эффектов в условиях чрезмерного усиления пролиферативной активности иммунокомпетентных клеток, в том числе при бласттрансформации.

Литература

1. Бычко Г.Н., Гапанович В.Н., Федерякин С.С. и др. Разработка технологии получения полисахаридов животного происхождения – субстанции иммуномодулирующего препарата / Тез. докл. X Российского национального конгресса “Человек и лекарство”; Москва, 7-11 апреля 2003 г. – М., 2003. – С. 588-589.
2. Методические материалы по экспериментальному (фармакологическому) и клиническому испытанию иммуномодулирующего действия фармакологических средств: Метод. Рекомендации / Фармакологический комитет СССР; сост. Р.В. Петров, Р.М. Хаитов, В.М. Манько и др. – М., 1984. – 37 с.
3. Методические рекомендации по экспериментальному (доклиническому) испытанию иммуномодулирующего действия фармакологических средств: Метод. рекомендации / НИИ гематол. и перелив. крови; сост. М.П. Потапнев, Л.Г. Борткевич., Д.В. Печковский и др. – Минск, 1999. – 32 с.
4. Потапнев М.П., Мартинович А.Е., Мыслицкий В.Ф. Лимфотоксичность *in vitro* как критерий качества рекомбинантного интерлейкина-2 человека / Проблемы

стандартизации и контроля качества лекарственных средств: Тез. докл. Всесоюзн. конф.; Москва, 18-21 декабря 1991 г. – М., 1991. – т. № 3. – С. 46-48.

5. Синилова Н.Г., Дуплищева А.П., Кириличева Г.Б. и др. Изучение иммуномодулирующих свойств фосфолипидов // Вопр. мед. химии. – 1990. – т. 36. – № 3. – С. 34-36.

6. Ярилин А.А. Основы иммунологии. – М., “Медицина”, 1999. – 608 с.

7. Boyum A. Separation of leukocytes from blood and bone marrow. Isolation of mononuclear cells by one centrifugation and sedimentation at 1 g // Scand. Clin. Lab. Invest. – 1986. – V. 21, №. 97. – P. 77-89

РЕПОЗИТОРИЙ БГМУ