

## ИММУНОПОЭЗМОДУЛИРУЮЩИЕ И ЭРИТРОПОЭЗМОДУЛИРУЮЩИЕ СВОЙСТВА ТРЕКРЕЗАНА ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ ИММУНОДЕФИЦИТЕ

Т. Г. Сухенко, О. П. Колесникова, В. А. Козлов<sup>1</sup>

Изучали влияние трекрезана (нового биостимулятора с иммуноактивными свойствами) на иммуно- и эритропоэз у мышей (C57BL/6 × DBA/2)F1 с иммунодефицитным и анемическими синдромами, индуцированными хронической реакцией трансплантат против хозяина. Препарат обладает сочетанными эритро- и иммунопоэзмодулирующими свойствами: устраняет анемию, снижает количество ядросодержащих эритроидных предшественников в костном мозге у больных мышей, нормализует первичный гуморальный иммунный ответ; снижает повышенную продукцию ИЛ-1. Обсуждаются возможные механизмы действия препарата.

**Ключевые слова:** трекрезан, иммунодефицит, анемия, интерлейкин-1, мыши

### ВВЕДЕНИЕ

Лечение вторичных иммунодефицитных и анемических синдромов, зачастую протекающих совместно, обуславливает актуальность поиска новых эффективных иммуномодуляторов. По данным патентной информации и нашим результатам к числу таких средств может быть отнесен трекрезан ([трис-(2-оксиэтил)аммония-орто-крезоксацетат]), обладающий иммуноактивными и противовоспалительными свойствами [6, 7]. Сочетание этих свойств с антиоксидантным, мембраностабилизирующими и другими важными свойствами трекрезана как адаптогена, а также его низкая токсичность (препарат относится к классу практически нетоксичных веществ) позволяют прогнозировать эффективность его применения при вторичных иммунодефицитах, сочетающихся с анемией.

Изучение патогенеза вторичных иммунодефицитных состояний, сочетающихся с анемией, а также скрининг новых средств, обладающих иммуно- и эритропоэзмодулирующими свойствами, обуславливает необходимость использования адекватных моделей на экспериментальных животных. Одной из таких моделей являются мыши (C57BL/6 × DBA/2)F1, у которых индукция хронической реакции трансплантат против хозяина (РТПХ) приводит к развитию вторичного иммунодефицита и анемического синдрома [4].

Цель исследования — оценить влияние трекрезана на эритро- и иммунопоэз у мышей B6D2F1 с иммунодефицитом (ИД).

### МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Эксперименты проводили на мышцах самках (C57BL/6 × DBA/2)F1 (B6D2F1), полученных из экспериментальной клиники животных СО РАМН.

ИД моделировали путем индукции хронической РТПХ, для чего мышам B6D2F1 внутривенно переносили лимфоидные клетки родительской линии DBA/2 в концентрации  $50 \cdot 10^6$ /мышь [12]. На 6 – 7-м месяце после индукции РТПХ у части животных уровень белка в моче статистически не отличался от контроля (условно животные обозначены как мыши с ИД), у других — морфологически выявлен иммунокомплексный гломерулонефрит (ИКГ) с протеинурией 3 – 5 г/л и более (животные с ИКГ) [5]. Срок от момента индукции РТПХ условно принят нами как длительность заболевания. В работе использовали мышей с ИД на 6 – 7-й месяц от начала заболевания.

Способность мышей к иммунному ответу (по количеству антителообразующих клеток (АОК)) на эритроциты барана (ЭБ) оценивали на 4-е сутки по количеству локальных зон гемолиза в полужидкой среде модифицированным методом после внутривенного введения  $2 \cdot 10^8$  ЭБ [10].

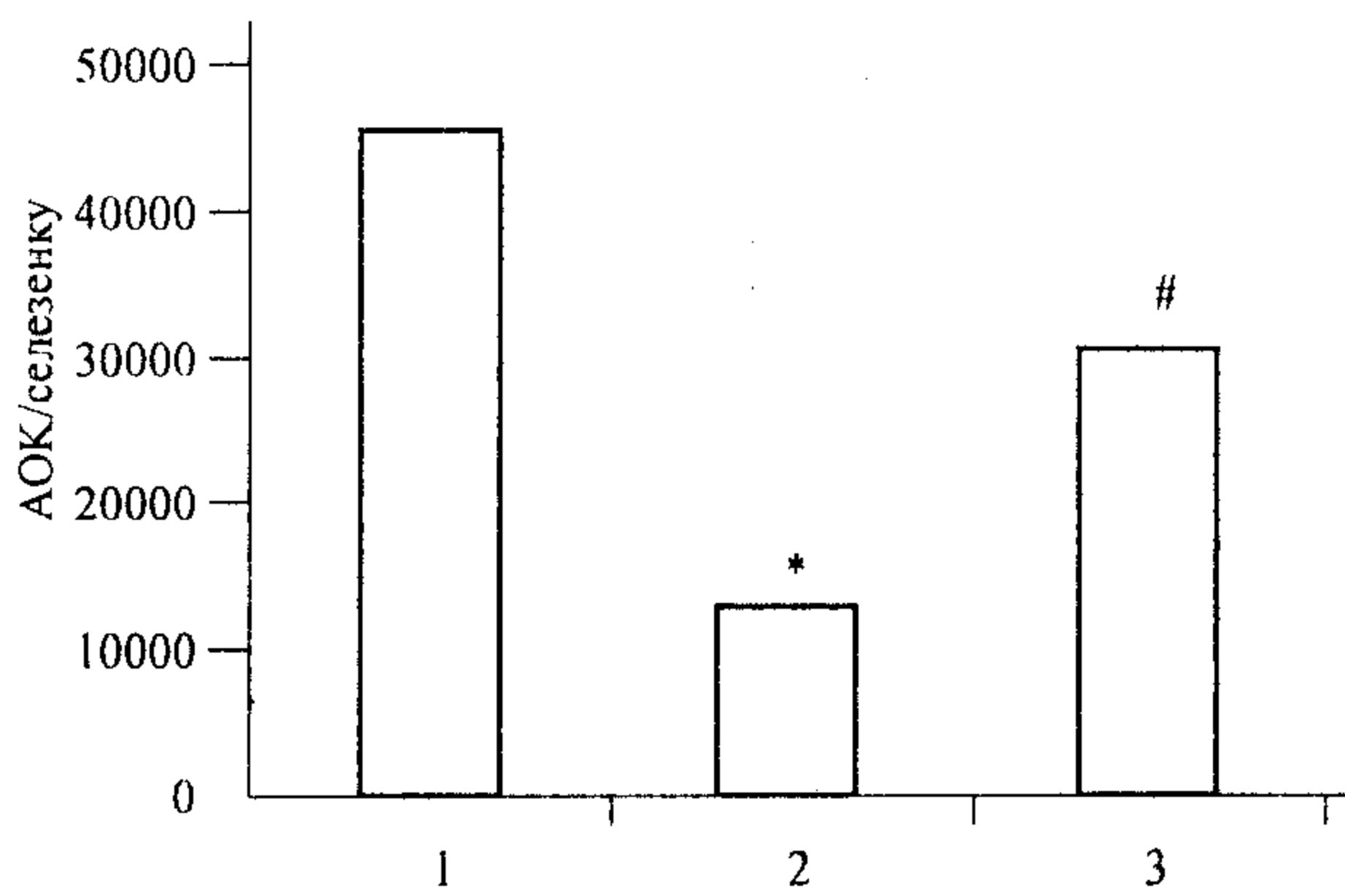
Ретикулоциты определяли в мазках периферической крови, окрашенных азур II. Мазки костного мозга окрашивали азур II-эозином по Паппенгейму – Крюкову.

Оценку эритроидных быстрообразующих единиц (БОЕ-э) проводили по общепринятой методике с использованием 0,9 % метилцеллюлозной культуры [1].

Содержание стволовых кроветворных клеток в костном мозге мышей определяли по числу колониеобразующих единиц в селезенке (КОЕс) сублетально облученных сингенных реципиентов в различные сроки после трансплантации им клеток костного мозга [15].

Определение продукции интерлейкина-1 (ИЛ-1) перитонеальными макрофагами, стимулированными 10 % раствором пептона, проводили по общепринятой методике [9]. В качестве стимулятора макрофагов использовали липополисахарид (ЛПС) E. Coli в концентрации 15 мкг/мл. ИЛ-1 активность оценивали методом измерения пролиферативного ответа тимоцитов

<sup>1</sup> Институт клинической иммунологии СО РАМН, Новосибирск, 630099, ул. Ядринцевская, 14.



**Рис. 1.** Влияние трекрезана на первичный гуморальный иммунный ответ у мышей B6D2F1 с иммунодефицитом.

Здесь и на рис. 2: 1 — интактные мыши, 2 — мыши с иммунодефицитом, 3 — мыши с иммунодефицитом, леченные трекрезаном. Различия достоверны ( $p < 0,01$ ) между: группой 1 и группой 2, # — группой 2 и группой 3.

мышей на субоптимальную дозу конканавалина А (Кон А) [1]. Оценку данных проводили с помощью индекса стимуляции (ИС). Супернатант тестировали в разведениях 1:1.

Больные мыши получали курс лечения трекрезаном: 12 инъекций через день внутривенно в дозе 50 мг/кг.

Статистическую обработку данных проводили непараметрическим способом с помощью U-критерия Вилкоксона — Манна — Уитни.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Ранее нами было установлено, что у мышей на 6 — 7-й месяц болезни развивается вторичный иммунодефицит, характеризующийся снижением первичного гуморального иммунного ответа. В результате введения больным животным трекрезана количество АОК в селезенке достоверно повышалось в 2,4 раза (рис. 1).

Вторичный иммунодефицит у мышей B6D2F1 сопровождался анемией с гиперплазией эритроидных предшественников в костном мозге. Введение трекрезана приводило к достоверному повышению уровня гемоглобина и гематокрита. Из данных, представленных в таблице видно, что у мышей с ИД количество

ретикулоцитов в периферической крови и процент эритрокариоцитов в мазках костного мозга выше, чем у интактных животных. После лечения трекрезаном количество ретикулоцитов и эритрокариоцитов снижалось практически до контрольных значений. Статистически значимо улучшались и другие показатели эритропоэза в костном мозге. Так, если до введения трекрезана у мышей с ИД наблюдалось значительное повышение БОЕ-э в костном мозге, то после проведенного курса лечения количество БОЕ-э снижалось в 1,6 раза. Количество экзогенных селезеночных колоний дает возможность оценить состояние кроветворения с его наиболее ранних этапов. У мышей с ИД количество КОЕс на 5 и 8-е сутки было достоверно повышено по сравнению с контролем. Курсовое введение трекрезана больным животным приводило к достоверному снижению числа КОЕс-8 и практически не влияло на количества КОЕс-5.

Таким образом, установлено, что трекрезан, устраняя анемию, снижает гиперплазию эритрона у мышей с ИД. Такое действие трекрезана на эритропоэз может быть связано как с прямым влиянием препарата на клеточные элементы эритроидного ростка, так и с опосредованным, через монокины. В предыдущих работах нами было установлено, что у мышей с ИД перитонеальные макрофаги секретируют повышенное количество провоспалительных цитокинов, в частности ИЛ-1 [4]. В связи с этим мы оценивали влияние трекрезана на секрецию ИЛ-1 у больных животных. Обнаружили, что после лечения достоверно снижалась как спонтанная, так и ЛПС-стимулированная продукция ИЛ-1 в 1,8 и 2,2 раза соответственно (рис. 2).

Одним из механизмов иммуно- и эритропоэзмодулирующего действия трекрезана является его влияние на продукцию ИЛ-1. Известно участие ИЛ-1 в гуморальном иммунном ответе [2]. Так, ИЛ-1 стимулирует пролиферацию преактивированных В-лимфоцитов, влияет на синтез иммуноглобулинов, в частности, на IgG [3]. ИЛ-1 активирует Т-лимфоциты-хелперы, продуцирующие ИЛ-4 (Т-хелперы 2 типа) и регулирует продукцию IgG. Добавление антисыворотки против ИЛ-1 в культуру лимфоцитов больных СКВ не только значительно ингибировало синтез иммуноглобулинов

### Влияние трекрезана на эритропоэз у мышей B6D2F1 с иммунодефицитом

Показатель	Контроль	Мыши с ИД	Мыши с ИД + трекрезан
Гемоглобин, г/л	189,0 ± 2,9 (30)	165,6 ± 2,3** (20)	191,6 ± 5,6 <sup>##</sup> (15)
Гематокрит, %	49,4 ± 0,4 (30)	45,9 ± 0,14** (20)	47,1 ± 0,5 <sup>##</sup> (15)
Количество ретикулоцитов, %	10,3 ± 1,3 (30)	15,9 ± 0,8** (20)	10,0 ± 0,7 <sup>##</sup> (15)
Количество эритрокариоцитов, %	28,5 ± 1,5 (20)	34,4 ± 1,5** (20)	27,8 ± 2,3 <sup>##</sup> (15)
БОЕ-э/10 <sup>5</sup> клеток костного мозга	6,75 ± 0,53 (15)	20,25 ± 1,6** (15)	12,7 ± 2,3 <sup>##</sup> (10)
КОЕс-5 в селезенке	9,7 ± 0,8 (20)	14,2 ± 1,3* (20)	16,1 ± 2,1 (20)
КОЕс-8 в селезенке	12,1 ± 1,4 (20)	19,8 ± 1,4** (20)	12,4 ± 1,1 <sup>#</sup> (20)

**Примечание.** \* —  $p < 0,05$ , \*\* —  $p < 0,01$  относительно контроля; # —  $p < 0,05$ , <sup>##</sup> —  $p < 0,01$  относительно больных мышей. В скобках — количество использованных мышей.

(около 90 %), но и снижало число Ig-секретирующих клеток [11]. Повышенная продукция IgG наблюдается у больных СКВ и связана, по мнению авторов, с повышенной продукцией ИЛ-1 [3]. У мышей с ИД анемия, вероятно, имеет иммунную природу, косвенным подтверждением чего является повышенное содержание в крови IgG [5]. Из работы [14] известно, что у мышей NZB фракцию антиэритроцитарных антител составляют IgG. Таким образом, можно предположить, что трекрезан, снижая продукцию ИЛ-1, влияет на антителиобразование и, таким образом, устраняет анемию.

Ранее нами было сделано предположение, что гиперплазия эритрона у мышей В6D2F1 с ИД является одной из причин подавления гуморального иммунного ответа [4]. Купирование анемии трекрезаном сопровождается устранением гиперплазии эритрона и, возможно, снижением количества эритроидных супрессорных клеток и секретируемого ими Эр-супрессорного фактора, что способствует нормализации иммунного статуса.

Как следует из данных литературы [8, 13], хроническая РТПХ у мышей В6D2F1 приводит к активации эндогенного ретровируса. Трекрезан, обладая противовирусными и интерферогенными свойствами (данные не приводятся), возможно, угнетает репликацию эндогенного ретровируса у исследуемых мышей.

Таким образом, сочетание адаптогенных свойств трекрезана с иммуно- и эритропозмодулирующими, противовирусными, интерферогенными позволяет прогнозировать его эффективность при лечении иммунных расстройств различной этиологии, осложненных анемией.

## ВЫВОДЫ

1. Трекрезан оказывает иммуностимулирующее действие у мышей с реакцией трансплантат против хозяина индуцированным иммунодефицитом — повышает первичный гуморальный иммунный ответ.

2. Трекрезан снижает повышенную продукцию провоспалительного цитокина ИЛ-1 у больных животных.

3. Трекрезан повышает уровень гемоглобина и гематокрита, а так же нормализует показатели эритропоза в костном мозге у мышей с анемией.

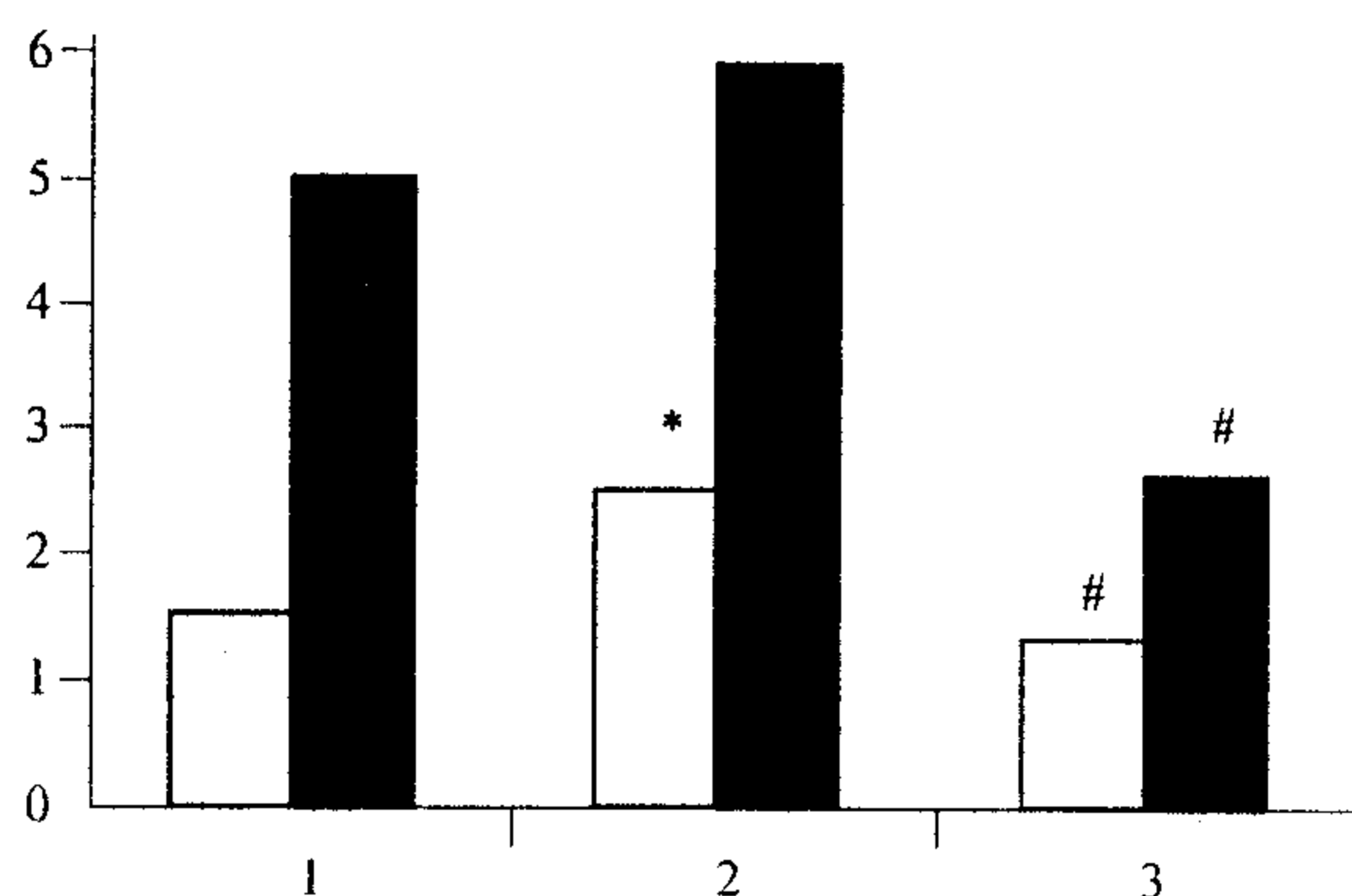


Рис. 2. Влияние трекрезана на спонтанную (светлые столбики) и ЛПС-стимулированную (темные столбики) продукцию ИЛ-1 у мышей В6D2F1 с иммунодефицитом.

По оси ординат — индекс стимуляции. Остальные обозначения те же, что на рис. 1.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Е. Д. Гольдберг, А. М. Дыгай, В. П. Шахов, *Методы культуры ткани в гематологии*, Томск (1992).
2. С. А. Кетлинский, А. С. Симбирцев, А. А. Воробьев, *Эндогенные иммуномодуляторы*, Санкт-Петербург (1992).
3. С. А. Кетлинский, Т. Г. Алексеева, Н. Д. Перумов и др., *Тер. арх.*, **65**(12), 51 – 54 (1993).
4. В. А. Козлов, О. П. Колесникова, Т. Г. Сухенко и др., *Иммунол.*, № 1, 36 – 38 (1995).
5. О. Т. Кудаева, О. П. Колесникова, М. Т. Войчук, *Тезисы докладов I Съезда иммунологов России*, Новосибирск (1992).
6. Р. О. Сабадышин, О. Я. Слипак, С. Ф. Ковальчук и др., *Бюл. эксп. биол.*, № 8, 186 – 188 (1998).
7. В. С. Ширинский, О. П. Колесникова, О. Т. Кудаева и др., *Экспер. и клин. фармакол.*, № 3, 42 – 45 (1993).
8. K. Brooks, L. Iciek, and M. Stuart, *J. cell. biochem.*, Suppl. 15a, 258 (1991).
9. J-M. Cavaillon, *Infection and immunity.*, **57**(3), 791 – 797 (1989).
10. A. J. Cunningham, *Nature*, **207**(4), 1106 – 1107 (1965).
11. R. C. Jandl, J. L. George, C. A. Dinarello and P. H. Sehur, *Clin. Immunol. Immunopathol.*, **45**(3), 384 – 394 (1987).
12. M. Kimura, T. Ida, K. Shimada, and Y. Kanai, *Clin. and exp. immunol.*, **69**(2), 385 – 393 (1987).
13. A. G. Rolink and E. Gleichmann, *J. Exp. Med.*, **58**(2), 546 – 558 (1983).
14. B. B. Scott, S. Sandigh, M. Stow M. et all., *Clin. Exp. Immunol.*, **93** (1), 26 – 33 (1993).
15. G. E. Till and E. A. McCulloch, *Radiat. res.*, **14**(2), 213 – 222 (1963).

Поступила 24.03.2000

## IMMUNO- AND ERYTHROPOIESIS MODULATED BY TRECRESAN IN MICE WITH EXPERIMENTAL IMMUNODEFICIENCY

T. G. Sukhnenko, O. P. Kolesnikova, and V. A. Kozlov

Institute of Clinical Immunology, Siberian Division, Russian Academy of Medical Sciences, ul. Yadrntsevskaya, 14, Novosibirsk, 630099 Russia

The effect of trecrezan, a new immunostimulant, was studied in (C57BL/6 × DBA/2)F1 mice with immunodeficiency and anemia syndromes induced by a chronic guest-versus-host reaction. The drug combines immuno- and erythromodulatory properties, being capable of eliminating anemia, decreasing the number of erythrocytes and BFUs in bonemarrow of ill mice, and normalizing primary humoral immune response. Possible mechanisms of trecrezan action are discussed.