

ИММУНО- И ЭРИТРОПОЭЗАКТИВНЫЕ СВОЙСТВА ИНДОЛ-3-ИЛСУЛЬФАНИЛАЦЕТАТА ТРИС-(2-ГИДРОКСИЭТИЛ)АММОНИЯ

Ольга Петровна КОЛЕСНИКОВА¹, Анна Николаевна МИРСКОВА², Сергей Николаевич АДАМОВИЧ², Ольга Тимофеевна КУДАЕВА¹, Рудольф Григорьевич МИРСКОВ², Михаил Григорьевич ВОРОНКОВ²

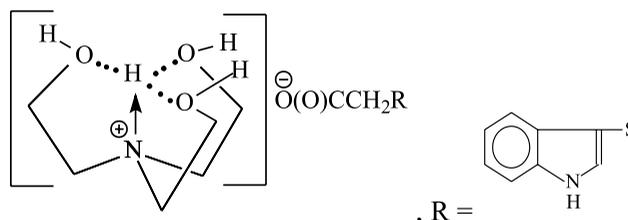
¹НИИ клинической иммунологии СО РАМН
630099, г. Новосибирск, ул. Ядринцевская, 14

²Иркутский институт химии им. А.Е.Фаворского СО РАН
664033, г. Иркутск, ул. Фаворского, 1

Настоящая работа посвящена исследованию иммуно- и гемопоэзаактивных свойств нового биологически активного вещества индол-3-илсульфанилацетата трис-(2-гидроксиэтил)аммония (соединение ВМ-2-84). Установлено, что у интактных животных *in vivo* соединение достоверно стимулирует первичный и вторичный гуморальный иммунный ответ, фагоцитарную активность макрофагов, подавляет реакцию гиперчувствительности замедленного типа. В культуре *in vitro* соединение дозозависимо ингибирует спонтанную и митоген-стимулированную пролиферацию спленоцитов, подавляет стимулированную продукцию провоспалительных цитокинов (ИЛ-1 β , ФНО α). Соединение оказывает выраженный эффект на костномозговые гемopoэтические предшественники эритропоэза. В культуре *in vitro* стимулирует рост гранулоидных и тормозит рост эритроидных колоний. В экспериментальной модели аутоиммунного заболевания (иммунокомплексный гломерулонефрит) соединение ВМ-2-84 проявляет выраженный терапевтический эффект (устраняет анемию, повышает массу тела животных, снижает СОЭ, стойко снижает протеинурию), что обусловлено угнетением продукции провоспалительных цитокинов, подавлением гиперплазии эритропоэза с ранних стадий дифференцировки эритрона у больных мышей. По данным морфологического изучения, соединение тормозит развитие мезангиального пролиферативного гломерулонефрита.

Ключевые слова: (индол-3-ил)сульфанилалканкарбоновые кислоты, алканоламмониевые соли, модель иммунокомплексного гломерулонефрита, иммунитет, анемия.

Ранее мы показали, что трис-(2-гидроксиэтил)аммониевые соли органилгетероуксусных кислот общей формулы $[RYCH_2COO]^- \cdot [NH(CH_2CH_2OH)]_3^+$, где R = Ar, Het; Y = O, S, SO₂, катион которых имеет 2,8,9-тригидропротатрановую структуру [1], облегчающую проникновение через клеточные мембраны, являются новым классом фармакологически активных веществ, обладающих антиагрегационной, мембранстабилизирующей, антиоксидантной, противовоспалительной, противоопухолевой, антимастатической, анальгетической, кардиотропной, гипохолестеринемической и др. активностью [2–8], существенно превосходящей или отличающейся от действия исходных биологически активных кислот и триэаноламина. В литературе ограничены сведения об иммуномодуляторных свойствах производных (индол-3-ил)сульфанилуксусной кислоты [4]. Целью настоящего исследования является изучение иммуно- и эритропоэзаактивных свойств нового биологически активного вещества—индол-3-илсульфанилацетата трис-(2-гидроксиэтил)аммония (соединение ВМ-2-84):



Соединение ВМ-2-84 относится к нетоксичным веществам: LD₅₀ при внутрибрюшинном введении равна 3000 мг/кг, при введении через рот — LD₅₀ — 4460 мг/кг [2]. В хроническом опыте при введении в дозе 10 мг/кг изменений в тканях органов животных не выявлено.

Материал и методы

В работе использовали здоровых половозрелых мышей линии DBA/2 и гибридов (CBAxС57BL/6)F1 (СBF1), (С57BL/6xDBA/2)F1 (BDF1) обоего пола, 8–10 недельного возраста, массой тела 18–20 г. Разброс в группах по исходной массе тела не превышал $\pm 10\%$. Контрольные и опытные животные были одного возраста, получены одновременно из питомника «Рассвет» (г. Томск). До эксперимента и в период

Колесникова О.П. — д.м.н., зав. лабораторией экспериментальной иммунотерапии, e-mail: iscreen2001@mail.ru

Мирскова А.Н. — д.х.н., проф., главн.н.с., e-mail: mirskova@irioch.irk.ru

Адамович С.Н. — к.х.н., старш.н.с.

Кудяева О.Т. — д.б.н., вед.н.с.

Мирсков Р.Г. — д.х.н., проф., вед.н.с.

Воронков М.Г. — академик РАН

его проведения контрольных и опытных мышей содержали в виварии в одинаковых условиях: в стандартных пластиковых клетках с мелкой древесной стружкой (не более 10 особей) на стандартном рационе. Все исследования проводили в одно и то же время суток (утром). Опыты выполняли в соответствии с правилами, принятыми Европейской конвенцией по защите животных (Страсбург, 1986), и одобренными комитетом по биомедицинской этике НИИ клинической иммунологии СО РАМН.

Соединение растворяли в среде RPMI-1640 и использовали в разных дозах относительно LD_{50} . Контрольным животным в таком же объеме и режиме вводили среду RPMI-1640. Контрольные и опытные группы состояли не менее чем из 10 мышей.

Количество антителообразующих клеток, секретирующих IgM (IgM АОК) в селезенке мышей, оценивали на 4-е сутки после иммунизации эритроцитами баран (ЭБ) по количеству зон локального гемолиза в полужидкой среде модифицированным методом [9]. Количество IgG АОК определяли в селезенке на пике иммунного ответа (на 5-е сутки после вторичной иммунизации) методом локального гемолиза [10]. Результаты выражали в абсолютном количестве IgM и IgG АОК в селезенке. Клеточный иммунный ответ оценивали по реакции гиперчувствительности замедленного типа (ГЗТ) [11].

Модель иммунокомплексного гломерулонефрита вызывали у самок мышей B6D2F1 двукратным с недельным интервалом внутривенным введением лимфоидных клеток от самок родительской линии DBA/2 [12]. Содержание белка в моче определяли калориметрически с кумасси бриллиантовым голубым («Loba Feinchemie», Австрия) на Titertec Multiscan («Flow Laboratories», США), длина волны 570 нм. В опытах использовали мышей со стойкой протеинурией и содержанием белка 3 мг/мл и более (концентрацию белка в моче определялся неоднократно). СОЭ определяли капиллярным методом, гематокрит — при помощи микроцентрифуги МЦГ-8 (Россия), в которую помещали капиллярные трубочки с кровью; по отсчетной шкале, приложенной к центрифуге, измеряли величину гематокрита в процентах. Для определения концентрации гемоглобина использовали набор для измерения содержания гемоглобина в крови бесцианидным гемихромным методом «Гемоглобин-Ново» («Вектор-Бэст», Россия). Количество ретикулоцитов на 1000 эритроцитов подсчитывали в мазках крови после окраски бриллиантовым крезоловым синим.

В мазках костного мозга мышей, окрашенных азуром II — эозином по Паппенгейму — Крюкову, подсчитывали процент ядросодержащих эритроидных предшественников. Оценку эритроидных бурстобразующих единиц костного мозга (БОЕ-э) проводили по общепринятой методике с использованием 0,9% метилцеллюлозной культуры.

Митоген-индуцированную пролиферацию клеток селезенки выполняли стандартным способом. Клетки селезенки мышей культивировали в круглодонных планшетах для иммунологических реакций («Linbro», США) при +37 °C в атмосфере 5% углекислого газа и 95% воздуха. Клетки стимулировали митогенами — конканавалином А (Кон А, Pharmacia, Fine Chemicals, Швеция) или липополисахаридом (ЛПС *E. coli* 055:B5, «Sigma»). Концентрации митогенов подбирались предварительным титрованием и использовались в оптимальной, субоптимальной и высокой дозах, что составило для Кон А 5, 10 и 25 мкг/мл соответственно, а для ЛПС — 25, 50 и 100 (в части опытов — 200) мкг/мл соответственно. Соединение вносили в лунки одновременно с митогеном. Пролиферативную активность клеток оценивали по включению 3H -тимидина в ДНК делящихся клеток. Результаты выражали в имп/мин включенного тимидина на 2×10^5 клеток.

Использовали спектрофотометрический микрометод для оценки Fc-рецептор-опосредованного фагоцитоза ЭБ макрофагами. Перитонеальные макрофаги, элиситированные пептоном, в концентрации 2×10^6 /мл культивировали в 24-луночных пластиковых планшетах («Linbro») в течение 2 часов в среде RPMI-1640, содержащей 10% эмбриональной телячьей сыворотки, 10 мМ Hepes, 2 мМ L-глутамин при температуре +37 °C в атмосфере высокой влажности с содержанием 5% CO_2 в воздухе. Затем к монослою макрофагов добавляли 1 мл 2,5% опсонизированных ЭБ и культивировали в тех же условиях в течение 40 минут, после чего нефагоцитированные эритроциты лизировали гипотоническим раствором NaCl. Для разрушения макрофагов и фагоцитированных ими эритроцитов в каждую лунку добавляли 0,6 мл 1% раствора додецилсульфата натрия (детергент), после чего количество гемоглобина, вышедшего из разрушенных ЭБ, определяли на Titertec Multiscan при длине волны 405 нм [13].

Определение активности ИЛ-1 и фактора некроза опухоли α (ФНО α) проводили в макрофагальном супернатанте. Для получения стимулированных перитонеальных макрофагов

мышам за 4 суток до забоя внутрибрюшинно вводили 10% раствор пептона. Клетки перитонеального экссудата, полученные путем промывания брюшной полости холодной средой 199, содержащей гепарин в концентрации 30 Ед/мл, инкубировали в течение 2 часов при температуре +37 °С в атмосфере 5% CO₂ в 24-луночных плоскодонных планшетах. Затем после двукратного отмывания в среде RPMI-1640 оставшиеся прилипшие клетки снимали с пластика резиновым полисменом. Полученная суспензия на 86–92% состояла из макрофагов, тестированных на наличие неспецифической эстеразы. Жизнеспособность клеток определяли с использованием 0,2% раствора трипанового синего, приготовленного на 0,9% растворе NaCl. Выделенные макрофаги в концентрации 10⁶ клеток/мл культивировали в 24-луночных пластиковых планшетах («Linbro») в течение 24 часов при температуре +37 °С и 5% содержанием CO₂ в атмосфере. Для культивирования использовали бессывороточную среду RPMI-1640 с добавлением 2 мМ L-глутамин, 40 мг/мл гентамицина и 10 мМ NERES. По окончании инкубации супернатант собирали, центрифугировали и замораживали при температуре –20 °С и в дальнейшем тестировали на наличие ИЛ-1 и ФНО α . В качестве стимулятора макрофагов *in vitro* использовали ЛПС *E. coli* в концентрации 15 мг/мл [14].

Соединение ВМ-2-84 добавляли в культуру макрофагов в начале культивирования, через 24 часа супернатант собирали и тестировали на наличие ИЛ-1- и ФНО α -активности. Активность ИЛ-1 оценивали биологическим методом — измерением пролиферативного ответа тимоцитов на субоптимальную дозу митогена [15]. Оценку данных проводили с помощью индекса стимуляции, который рассчитывали как отношение числа импульсов в минуту в Кон А-стимулированной культуре тимоцитов в присутствии и в отсутствие исследуемых супернатантов.

Супернатант тестировали при разведении 1:1. Для определения ФНО α -активности в макрофагальном супернатанте использовали ФНО α -чувствительную клеточную линию L-929 [16]. Суспензию клеток L-929 в концентрации 50 × 10⁴/мл помещали в лунки 96-луночного плоскодонного планшета («Linbro») в объеме 100 мкл в среде RPMI-1640, содержащей 10% эмбриональной телячьей сыворотки, 10 мМ Neres, 2 мМ L-глутамин. К клеткам добавляли актиномицин D в заранее оттестированной дозе 0,5 мкг/мл в объеме 100 мкл. Макрофагальный супернатант вводили в лунку при разведении 1:100. Инкубацию клеточной культуры проводили в атмосфере 5% CO₂ и 95% воздуха при температуре +37 °С в течение 18 часов. Учет активности ФНО α оценивали по результатам суправитальной окраски монослоя клеток кристаллическим фиолетовым, при этом окончательно учитывали процент погибших клеток.

Различия между группами оценивали с помощью непараметрического критерия U Вилкоксона — Манна — Уитни.

Результаты и обсуждение

При введении соединения ВМ-2-84 в индуктивную фазу первичного гуморального иммунного ответа на Т-зависимый антиген и в индуктивную фазу ГЗТ мышей соответственно иммунизировали и сенсибилизировали ЭБ в день последней инъекции соединения (ВМ-2-84 вводили в дозе 50 мг/кг трехкратно ежедневно внутрибрюшинно). Установлена достоверная стимуляция IgM-ответа и подавление ГЗТ. При инъекции соединения в такой же дозе и таком же режиме реципиентам в день индукции системной реакции «трансплантат против хозяина» (РТПХ) в полуаллогенной модели (введение 50 × 10⁶ клеток селезенки от родителя DBA/2 гибридам B6D2F1) не обнаружено эффекта (табл. 1).

Для оценки влияния ВМ-2-84 на вторичный гуморальный иммунный IgG-ответ соединение вводили 3 раза через день внутрибрюшинно в дозе 50 мг/кг до первичной и/или вторичной

Таблица 1

Влияние соединения ВМ-2-84 на первичный гуморальный иммунный ответ, ГЗТ, РТПХ у интактных мышей-самцов B6D2F1

Группа	Количество АОК на селезенку	ГЗТ (%)	РТПХ (масса селезенки, мг)
Контроль	35585 ± 3431	0,07 ± 0,01	100,0 ± 5,5 ^a
ВМ-2-84 50 мг/кг	78289 ± 6660**	0,036 ± 0,009*	112,4 ± 4,9

Примечание: а — средний вес селезенки при РТПХ достоверно превышает средний вес селезенки интактных мышей, равный 66,5 ± 4,8 мг (p < 0,01).

иммунизации ЭБ. Введение соединения до первичного контакта организма с антигеном в 2,2 раза увеличивает вторичный гуморальный иммунный ответ—до $3,62 \times 10^5$ IgG АОК (в контроле— $1,61 \times 10^5$ IgG АОК, $p < 0,05$). Будучи введен на фоне сформировавшейся иммунной памяти перед вторичной иммунизацией, ВМ-2-84 не меняет величину вторичного ответа: количество IgG АОК составляет $1,55 \times 10^5$ ($p > 0,05$). По-видимому, соединение оказывает действие на формирование пула клеток-памяти, отвечающих на повторное введение антигена.

Для оценки влияния ВМ-2-84 на фагоцитарную активность мышам В6D2F1 вводили соединение в дозах 5 и 50 мг/кг внутрибрюшинно трехкратно через день. В качестве препарата сравнения был использован зимозан в дозе 50 мг/кг, который вводили однократно внутрибрюшинно за сутки до забоя животных (рис. 1). Соединение ВМ-2-84 обладает достоверным стимулирующим влиянием на фагоцитарную активность макрофагов в дозах 5 и 50 мг/кг по сравнению с контролем. Кроме того, препарат в дозе 5 мг/кг сопоставим с действием зимозана, который известен как стимулятор макрофагов [17]. Повышение фагоцитарной активности макрофагов под действием соединения ВМ-2-84, может также сопровождаться увеличением антигенпрезентирующей способности клеток, что и приводит к стимуляции IgM-антителообразования. Учитывая, что влияние макрофагов на формирование АОК в селезенке опосредовано секрецией цитокинов, изучали эффект соединения ВМ-2-84 на продукцию ИЛ-1 и ФНО α перитонеальными макрофагами. Препарат вносили в культуру фагоцитов в дозах 10 и 50 мкг/мл. Установлено, что ВМ-2-84 в обеих концентрациях обладал достоверным супрессирующим действием как на спонтанную, так и на ЛПС-стимулированную продукцию ИЛ-1 (рис. 2, А). В то же время соединение

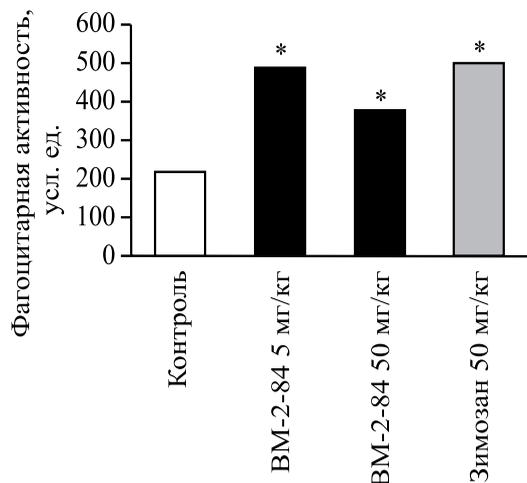


Рис. 1. Влияние ВМ-2-84 на фагоцитарную активность макрофагов интактных мышей. Здесь и на рис. 2, в табл. 1–2: *—отличие от величины соответствующего показателя в контроле достоверно при $p < 0,05$.

в концентрации 10 мкг/мл не влияло на спонтанную продукцию ФНО α *in vitro*, а в концентрации 50 мкг/мл достоверно ее стимулировало (в 2,7 раза) по сравнению с контролем. При этом ЛПС-стимулированная секреция ФНО α под влиянием ВМ-2-84 в концентрациях 10 и 50 мкг/мл статистически не отличалась от контрольных значений (рис. 2, Б). Таким образом, ВМ-2-84 стимулирует первичный и вторичный гуморальный иммунный ответ, фагоцитарную активность макрофагов при введении *in vivo*, но при этом снижает продукцию ИЛ-1 и повышает спонтанную секрецию ФНО α перитонеальными макрофагами при культивировании их с соединением *in vitro*.

ВМ-2-84 в дозе 5 мкг/мл достоверно снижает как спонтанную (с 45×10^3 до 10×10^3 имп/мин), так и стимулированную Кон А в дозе 10 мкг/мл пролиферацию клеток селезенки (с 78×10^3 до 28×10^3 имп/мин). В дозе 250 мкг/мл соединения резко, почти до нулевых значений, подавляет

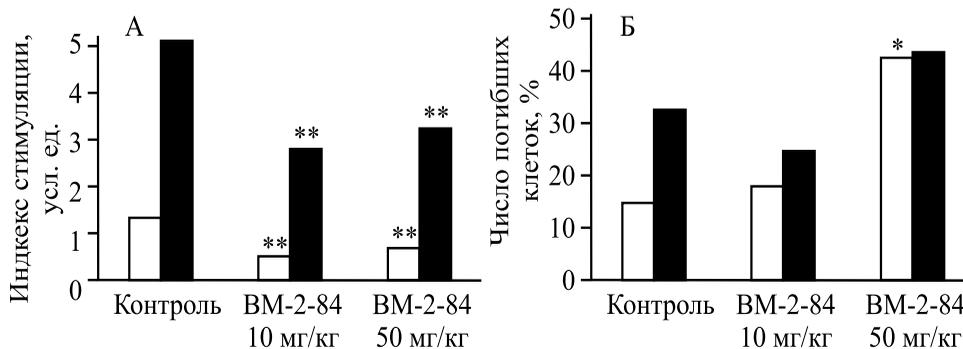


Рис. 2. Влияние ВМ-2-84 на спонтанную (□) и ЛПС-стимулированную (■) продукцию ИЛ-1 (А) и ФНО α (Б) у интактных мышей. Здесь и в таблицах: **—отличие от величины соответствующего показателя в контроле достоверно при $p < 0,01$.

спонтанную и стимулированную пролиферацию клеток селезенки, эффект сравним с действием известного иммунодепрессанта циклоспорина А. Антипролиферативные свойства ВМ-2-84 выявляются также в смешанной культуре лимфоцитов. Установлено ингибирующее действие соединения на ЛПС-индуцированную пролиферацию клеток селезенки (при дозе ЛПС 200 мкг/мл). Оценивая в целом иммуноактивные свойства ВМ-2-84 в культуре клеток селезенки *in vitro* можно отметить, что соединение проявляет антипролиферативные свойства в отношении как Т-, так и В-клеток селезенки.

Одним из перспективных и продуктивных подходов целенаправленной регуляции иммунной системы является воздействие на пролиферацию, дифференцировку и самоподдержание ранних гемопоэтических предшественников, поскольку элементы иммунной и кроветворной систем, имея единого предшественника — стволовую кроветворную клетку — и тесно взаимодействуя между собой, модулируют как иммуно-, так и гемопоэз [18, 19]. Имеются работы, указывающие на дисфункцию эритропоэза как на одно из звеньев в формировании патологии иммунной системы в различных экспериментальных моделях — аутоиммунных (мыши линии NZB), лимфо-пролиферативных заболеваний (мыши линии AKR), старческого иммунодефицита (мыши в возрасте 24–28 месяцев) [19–21]. Более того, показано, что нормализация пролиферативной активности ранних гемопоэтических предшественников с помощью ингибиторов гемопоэза приводит к нормализации иммунитета при аутоиммунных, иммунодефицитных и других нарушениях [22].

Ранее показано, что индукция хронической РТПХ в полуаллогенной системе (перенос лимфоидных клеток от родителя F1-гибридам) приводит наряду с Th2-зависимым вариантом иммунопатологии (lupus) к появлению у части мышей Th1-зависимого варианта (nonlupus). Варианты иммунопатологии кроме клинических отличий (наличие или отсутствие протеинурии) имеют различия в параметрах клеточного и гуморального иммунного ответа, функциональных свойств В-лимфоцитов [23]. Модель, сочетающая иммунодефицит, гемолитическую анемию и иммунокомплексный гломерулонефрит (Th2-, или lupus-мышь), является более тяжелым системным проявлением аутоиммунного заболевания, имеющим сходство с патологией у мышей NZB/WF1 и системной красной волчанкой у человека. Модель, сочетающая иммунодефицит и гемолитическую анемию (Th1-, или nonlupus-мышь), близка патологии у мышей NZB. Показано, что обе модели характеризуются разной степени выраженности нарушениями эритропоэза и соответственно анемии. У мышей lupus выявляются изменения пролиферативной активности стволовой кроветворной клетки и функциональной активности гемопоэтических предшественников эритроидного и гранулоидного направлений дифференцировки, что приводит к развитию у животных анемического синдрома с гиперплазией костномозгового эритропоэза [24].

Больным иммунокомплексным гломерулонефритом мышам соединение ВМ-2-84 в дозе 50 мг/кг вводили внутривентриально 12 раз с интервалом 24 часа. Через сутки после последней инъекции определяли массу тела, скорость оседания эритроцитов (СОЭ) и другие параметры, представленные в **таблице 2**.

Таблица 2

Влияние ВМ-2-84 на параметры иммуно- и эритропоэза у мышей B6D2F1 с иммунокомплексным гломерулонефритом

Исследуемые показатели	Контроль	Гломерулонефрит	Гломерулонефрит + ВМ-2-84
Масса тела, г	26,1 ± 0,8	21,3 ± 0,7**	25,2 ± 1,5#
Гемоглобин, г/л	199,2 ± 3,6	140,3 ± 6,9**	197,6 ± 4,6##
Гематокрит, %	49,4 ± 0,4	38,8 ± 1,4**	44,0 ± 0,7##
Эритрокарициты, %	27,5 ± 1,5	37,8 ± 2,8*	29,6 ± 2,4#
Ретикулоциты, ‰	10,0 ± 0,3	21,5 ± 1,2**	13,2 ± 0,4##
БОЕ-э /10 ⁵ клеток костного мозга	7,2 ± 0,5	22,3 ± 0,9**	12,1 ± 0,6##
Производство ИЛ-1 (индекс стимуляции):			
спонтанная	1,6 ± 0,1	2,8 ± 0,3**	1,8 ± 0,4#
ЛПС-стимулированная	5,8 ± 0,8	6,9 ± 0,5	5,1 ± 0,38#

Примечание. Отличие от величины соответствующего показателя у мышей с гломерулонефритом достоверно: # — при $p < 0,05$, ## — при $p < 0,01$.

Как видно из **таблицы 2**, курсовое введение соединения ВМ-2-84 приводит к достоверному повышению массы тела у мышей с гломерулонефритом. Достоверно снижалась СОЭ — с $11,2 \pm 3,3$ до $4,2 \pm 2,3$ мм/ч.

В работе использовали разные дозы соединения, для определения влияния ВМ-2-84 на уровень белка в моче использовали концентрацию 5 мг/кг. Мышам В6D2F1 с иммунокомплексным гломерулонефритом на 5–6 месяце заболевания проведено курсовое введение ВМ-2-84 в дозе 5 мг/кг в течение 40 дней через день (15 инъекций). Была образована группа мышей, имевших протеинурию 3 мг/мл и более, в среднем в группе она составляла $7,3 \pm 0,9$ мг/мл, т. е. эта группа из 14 животных на 100% состояла из больных мышей. Далее сразу после лечения снизилась не только частота протеинурии, т. е. количество мышей, имеющих белок в моче более 3 мг/мл, со 100 до 78%, но и ее средние показатели в группе (концентрация белка в моче составляла $5,6 \pm 0,9$ мг/мл). Через 2 месяца после окончания лечения 2 мыши пали, но у 12 животных в 86% случаев протеинурия была ниже 3 мг/мл, в среднем в группе была равна $2,5 \pm 0,4$ мг/мл, что достоверно ниже показателей до лечения ($p < 0,01$).

Иммунодефицит, развивающийся у мышей в экспериментальной модели, возможно, связан с супрессивным действием эритробластов, поэтому дальнейшая работа была посвящена изучению влияния соединения ВМ-2-84 на эритропоэз у мышей В6D2F1 с гемолитической анемией и иммунокомплексным гломерулонефритом. Как следует из **таблицы 2**, курс лечения соединением приводит к нормализации величины гематокрита и содержания гемоглобина у мышей с анемическим синдромом. Повышение гематокрита, вероятно, свидетельствует об увеличении числа ретикулоцитов. Если учесть, что у больных мышей анемия обусловлена гемолизом, то повышение содержания гемоглобина и гематокрита свидетельствует либо об устранении гемолиза, либо о еще большей активности костномозгового эритропоэза. Для уточнения характера действия соединения изучено количество ретикулоцитов в периферической крови, число эритрокариоцитов и бурстобразующих эритроидных единиц (БОЕ-э) в костном мозге. Как видно из **таблицы 2**, количество ретикулоцитов под влиянием соединения достоверно снижалось в 1,7 раза у мышей с иммунокомплексным гломерулонефритом. Курс лечения приводил к достоверному снижению количества ядросодержащих эритроидных

предшественников в костном мозге у животных. Количество БОЕ-э при введении ВМ-2-84 достоверно снижалось у мышей с иммунокомплексным гломерулонефритом. Таким образом, соединение ВМ-2-84 обладает выраженным эффектом на эритропоэз у больных животных, начиная с ранних этапов дифференцировки эритрона. Учитывая, что ВМ-2-84 устраняет гиперплазию эритрона у больных мышей, можно предположить, что купирование анемии связано с уменьшением гемолиза эритроцитов.

Анемия у мышей *lupus* и *nonlupus* является гемолитической и связана с влиянием макрофагов и секретируемых ими цитокинов на формирование аутоантител к эритроцитам, что явилось в дальнейшем объектом изучения эффектов ВМ-2-84 у больных мышей. О влиянии ВМ-2-84 на функциональную активность макрофагов у больных мышей В6D2F1 судили по фагоцитозу и продукции ИЛ-1 перитонеальными макрофагами. Курсовое лечение ВМ-2-84 мышей *nonlupus* приводило к достоверному (в 1,8 раза) снижению фагоцитарной активности макрофагов, спонтанной и митоген-стимулированной продукции ИЛ-1. Как спонтанная, так и ЛПС-стимулированная продукция ИЛ-1 перитонеальными макрофагами под влиянием ВМ-2-84 достоверно снижалась у *lupus*-животных (**табл. 2**). Курс лечения соединением ВМ-2-84 у мышей *nonlupus* приводит к достоверному повышению спонтанной продукции ФНО α и практически не влияет на ЛПС-стимулированную секрецию цитокина.

Таким образом, установлено, что соединение ВМ-2-84 нормализует функцию макрофагов у больных мышей, что, по-видимому, и обуславливает его лечебное действие. Уменьшением фагоцитоза и продукции ИЛ-1 под влиянием препарата предположительно можно объяснить повышение массы тела, снижение СОЭ и протеинурии у опытных мышей. Понижение секреции ИЛ-1, очевидно, приводит к снижению синтеза Т-хелперами 2 типа цитокинов (ИЛ-4, 5, 6), стимулирующих синтез В-клетками аутоантител к эритроцитам. В результате этого снижается гемолиз эритроцитов и нормализуются показатели костномозгового эритропоэза.

Заключение

Изучение иммуно- и эритропоэзактивных свойств нового биологически активного вещества — индол-3-илсульфанилацетата трис-(2-гидроксиэтил)аммония (соединение ВМ-2-84) выявило выраженные Т-лимфотропные, эритропоэзмодулирующие, иммунодепрессивные, противовоспалительные свойства,

20. Орловская И.А., Матросова В.Ю., Халдояниди С.К. Колониеобразующая активность клеток костного мозга мышей NZB в процессе развития аутоиммунной гемолитической анемии // I съезд иммунологов России: тез. докл. Новосибирск, 1992. 347.

Orlovskaya I.A., Matrosova V.Yu., Khaldoyanidi S.K. Colony-forming activity of marrow cells of NZB mice in the course of development of autoimmune hemolytic anemia // Proc. I congress of immunologists of Russia. Novosibirsk, 1992. 347.

21. Орловская И.А., Дубинина Л.В., Халдояниди С.К. и др. Изменения в возрастной структуре стволовых кроветворных клеток старых мышей под влиянием фактора, ингибирующего их пролиферативную активность // Онтогенез. 1994. 25. (3). 26–32.

Orlovskaya I.A., Dubinina L.V., Khaldoyanidi S.K. et al. The changes in age structure of hemopoietic stem cells of old mice under the effect of factor inhibiting their proliferative activity // Ontogenez. 1994. 25. (3). 26–32.

22. Орловская И.А., Шкловская Е.В., Козлов В.А. Негативные регуляторы гемопоэза. Гомеостатическая роль в формировании взаимоотношений между гемопоэтической и иммунной системами // Иммунология. 1996. (5). 8–13.

Orlovskaya I.A., Shklovskaya E.V., Kozlov V.A. Negative regulators of hemopoiesis. Homeostatic role in the formation of relation between hemopoietic and immune systems // Immunologiya. 1996. (5). 8–13.

23. Колесникова О.П., Кудяева О.Т., Ненашева Е.В. и др. Селективные иммунодепрессивные свойства нового производного индол-3-илсульфанилацетата // Бюл. СО РАМН. 2007. (2). 14–18.

Kolesnikova O.P., Kudaeva O.T., Nenasheva E.V. et al. Selective immunosuppressive properties of the new derivative of arylheteroalkancarboxylic acids // Byul. SO RAMN. 2007. (2). 14–18.

24. Сухенко Т.Г., Колесникова О.П., Филимонов П.Н. и др. Состояние иммуно- и эритропоэза у мышей с болезнью трансплантат против хозяина на фоне иммунодефицита // Журн. микробиол. эпидемиол. иммунол. 1999. (4). 56–60.

Sukhenko T.G., Kolesnikova O.P., Filimonov P.N. et al. Immuno- and erythropoiesis in mice with the diseases of transplant versus host against a background of immunodeficiency // Zhurn. microbiol. epidemiol. immunol. 1999. (4). 56–60.

IMMUNO- AND ERYTHROPOIESOACTIVE PROPERTIES OF INDOL-3-YL SULFANYL ACETATE OF TRIS-(2-HYDROXYETHYL) AMMONIUM

Olga Petrovna KOLESNIKOVA¹, Anna Nikolaevna MIRSKOVA², Sergey Nikolaevich ADAMOVICH², Olga Timofeevna KUDAeva¹, Rudolf Grigorievich MIRSKOV², Mikhail Grigorievich VORONKOV²

¹Institute of Clinical Immunology SB RAMS
14, Yadrintsevskaya str., Novosibirsk, 630099

²Irkutsk Institute of Chemistry n. a. A.E. Favorsky SB RAS
1, Favorsky str., Irkutsk, 664033

The present work is aimed at the investigations of immuno- and haemopoiesoactive properties of new biologically active compound, indol-3-yl sulfanyl acetate of tris-(2-hydroxyethyl) ammonium (compound BM-2-84). It has been found that the compound applied for intact animals *in vivo* stimulates primary and secondary humoral immune response and phagocytic activity of macrophages as well as suppresses reaction of inhibited hypersensitivity. *In vitro*, depending on the dosage the compound inhibits spontaneous and mitogen-stimulated proliferation of splenocytes, suppresses the stimulated production of proinflammatory cytokines (IL-1 β , TNF α). The compound exerts the pronounced action on marrowy hemopoietic precursors of erythropoiesis. Also, *in vitro* it stimulated the growth of granuloid colonies and inhibits the growth of erythroid ones. In experimental model of autoimmune diseases (immuno-complex glomerulonephritis) the compound BM-2-84 shows significant clinical effects (eliminates the anemia, increases the weight of animals, decreases ESR, steadily reduces proteinuria). The effects are due to the suppression of proinflammatory cytokines production, as well as erythropoiesis hyperplasia on early stages of differentiation of erythron in ill mice. According to the data of morphological studies, the compound inhibits the development of mesangial proliferative glomerulonephritis.

Key words: (indol-3-yl) sulfanyl alkane carbonic acids, alkyl ammonium salts, model of immuno-complex glomerulonephritis, immunity, anemia.

Kolesnikova O.P. — doctor of medical sciences, head of the laboratory of experimental immunotherapy, e-mail: iscreen2001@mail.ru

Mirskova A.N. — doctor of chemical sciences, professor, chief researcher, e-mail: mirskova@irioc.irk.ru

Adamovich S.N. — candidate of chemical sciences, senior researcher

Kudaeva O.T. — doctor of biological sciences, leading researcher

Mirskov R.G. — doctor of chemical sciences, professor, leading researcher

Voronkov M.G. — academician of RAS