

ИММУНОМОДУЛЯТОРНЫЙ ЭФФЕКТ ЭКДИСТЕРОНОВ

Досліджено вплив екдистерону, його 20-дезоксипохідного — α -екдизону, їхніх 2-дезоксипохідних, 2,3,22-триацетату екдистерону та препарату БТІ-4 на включення [^3H]тимідину до різних популяцій лімфоцитів тварин та людини. Показано, що екдистерон та його аналог у концентраціях 10^{-12} — 10^{-5} М справляють значну стимулятивну дію на біосинтезу ДНК у активованих поліклональними мітогенами лімфоцитах тварин. За підвищення концентрації екдистерону до 10^{-4} М спостерігається цілковите інгібування активівної дії поліклональних мітогенів. Не виявлено значущої залежності ефекту досліджених екдистеронів від їхньої структури. За випадку спленоцитів стимулятивний ефект екдистерону на біосинтезу ДНК виявляється менше, аніж за випадку активованих тимоцитів. Встановлено значний інгібівний вплив екдистерону на біосинтезу ДНК у культурі активованих конканаваліном А клітин лімфоцитів периферійної крові здорових донорів.

Биосинтетическая активность экдистероидов [1—3], вызываемая ими коррекция нарушений липидного обмена [4], а также воздействие на жизнеспособность и продуктивность ряда организмов, независимо от того, являются ли эти стероиды их эндогенными составляющими [5], побудили нас исследовать эффект экдистероидов на функциональную активность различных популяций лимфоцитов.

Появившиеся недавно работы [6, 7] свидетельствуют об увеличении количества антителообразующих клеток в селезенке мышей, иммунизированных внутрибрюшинным введением эритроцитов барана, при действии небольших доз экдистероидов (1, 2, 5—20 мг на 1 кг массы) и их уменьшении при увеличении доз экдистерона до 50 мг на 1 кг массы. В культуре же лимфоцитов человека, поликлонально стимулированных фитогемагглютинином, иммуномодулирующий эффект экдистероидов в концентрации 10^{-7} — 10^{-5} М на трансформацию лимфоцитов не выявлен.

В данной работе исследовано влияние основных гормонов линьки и метаморфоза насекомых — экдистерона и его 20-дезоксипроизводного — α -екдизона, выделенных из растений вида *Serratula coronata* [5], а также 2-дезоксидекдистерона и 2-дезоксидекдизона, выделенных из растений вида *Silene praemixta* [8] и ответственных за гаметогенез у насекомых; 2,3,22-триацетата экдистерона, полученного согласно [9], и одного из комплексных препаратов из *Serratula inermis*, содержащего экдистерон в качестве мажорного компонента [10], на включение [^3H]тимидина в лимфоциты различных популяций — тимоцитов крысы, тимоцитов и спленоцитов мыши, а также Т-лимфоцитов периферической крови человека.

Материалы и методы

Лимфоциты тимуса крысы выделяли путем разволакивания ткани пинцетами в среде RPMI-1640 [11]. Среда содержала HEPES (20 мМ), NaHCO_3 (1,5 мг/мл), гентамицин (10 мг/мл), фунгизон (1,140 мкл/мл), β -меркаптоэтанол (5×10^{-5} М), инсулин (60 ед/л) и прогретую до 56°C сыворотку крови крупного рогатого скота, рН среды доводили до 7,2 7,5 %-м раствором бикарбоната натрия. Суспензию клеток фильтровали через капроновое сито и дважды промывали, центрифугируя при 800 g 10 мин.

Лимфоциты селезенки мыши выделяли на холоду, раздвигая ткани пинцетами, затем гомогенизировали крупные фрагменты в вышеописанной среде выделения. Суспензию клеток помещали в кони-

ческие пластики надосадочную окривания (растворе NaCl клеток.

Лимфоциты центрифуговали при концентрации $0,5 \times 10^7$ клеток в культуральной среде при концентрации 5 г/л. Терминальный пункт конечной концентрации экдистероидов 10^{-3} М.

Лимфоциты центрифугировали при диаметре 12 см (производство ферической кассеты) и интервалы в среднем $(10^{-6}$ Ки/мл).

Включенность определяли по лимфоцитам «тап-3ММ» и радиоактивности ЖС-1.

Результаты

Для исследования были использованы лимфоциты крысы (митогенами стимулируемые клетки) и белки (ст 10^{-12} до 10^{-5} М до опыта в культуре), культуры (новые клетки) и культуры (новые клетки) циты животины (физиологически активные) выбранных предельных значений ней мышей.

Через 7 дней в кислотонесущей среде экдистероидов (содержание новых клеток).

Прежде чем использовать активную среду LPS. Так, в культуре тимоцитов (содержание $\times 10^3$ имп/мл) ванных в присутствии находилась (статистически незначительно) контрольные культуры.

Включенность 10^{-7} М или

ческие пластиковые пробирки и после пятиминутного отстаивания надосадочную жидкость центрифугировали (200 g, 10 мин) [12].

Жизнеспособность лимфоцитов определяли методом витального окрашивания 0,1 %-м раствором трипанового синего в изотоническом растворе NaCl. Полученная суспензия содержала не менее 95 % живых клеток.

Лимфоциты культивировали в среде выделения при 37 °С. Концентрация Т-клеток составляла 1×10^7 клеток в 1 мл, В-клеток — $0,5 \times 10^7$ клеток в 1 мл. Активацию Т-лимфоцитов вызывали внесением в культуральную среду конканавалина А (Кон А) до конечной концентрации 5 мкг/мл. Для активации спленоцитов использовали бактериальный липополисахарид *W Esherichia coli* 055:85 (LPS), конечная концентрация которого составляла 50 мкг/мл. Концентрация экдистероидов в среде культивирования варьировала от 10^{-12} до 10^{-3} М.

Лимфоциты крови человека выделяли методом дифференциального центрифугирования [13]. В пластиковые пробирки с внутренним диаметром 12—14 мм последовательного наслаивали 3 мл Фиколла (производство «Fagmacia Fine Chemicals») и 7 мл лейкозвеси периферической крови. После центрифугирования (1000 g, 30 мин) лимфоциты интерфазы собирали, трижды промывали средой и культивировали в среде выделения. Клетки инкубировали 72 ч, [^3H]тимидин (10^{-6} Ки/мл) добавляли за 24 ч до конца культивирования.

Включение меченых предшественников в ДНК исследуемых клеток определяли по радиоактивности кислотонерастворимого осадка лимфоцитов после их осаждения на бумажных фильтрах «Whatman-3ММ» и промывания 6 %-й ТХУ, H_2O и этиловым спиртом. Радиоактивность фильтров подсчитывали в сцинтилляционной жидкости ЖС-1.

Результаты и обсуждение

Для изучения влияния экдистерона на лимфоциты животных были выбраны следующие две экспериментальные модели. I. Тимоциты крысы и спленоциты мыши активировали поликлональными митогенами и культивировали в присутствии экдистероидов (опытные клетки) и без них (контроль). Концентрацию экдистероидов меняли от 10^{-12} до 10^{-3} М. II. Тимоциты и спленоциты мышей, которым за 1 ч до опыта внутрибрюшинно вводили экдистерон (50 мг на 1 кг массы тела), культивировали в присутствии поликлональных митогенов (опытные клетки). В качестве контроля использовали тимоциты и спленоциты животных, которым за 1 ч до опыта внутрибрюшинно вводили физиологический раствор. Концентрация экдистерона и время его введения выбраны на основании представленной ранее [14] кинетики расщепления и выведения [^3H]экдистерона из разных органов и тканей мышей.

Через 72 ч культивирования измеряли включение [^3H]тимидина в кислотонерастворимый осадок клеточной суспензии. О влиянии экдистероидов судили по разнице радиоактивности опытных и контрольных клеток.

Прежде всего мы убедились, что экдистерон не обладает митогенной активностью, сравнимой с таковой используемых нами Кон А и LPS. Так, включение [^3H]тимидина в ДНК Кон А-стимулированных тимоцитов крысы через 72 ч культивирования составило $18,4 \pm 1,1 \times 10^3$ имп/мин на 1×10^7 клеток. Радиоактивность клеток, культивированных в присутствии экдистерона в концентрации 10^{-7} М или 10^{-6} М, находилась в пределах $4,6 \pm 1,1 \times 10^3$ имп/мин на 1×10^7 клеток и практически не отличалась от радиоактивности не активированных Кон А контрольных тимоцитов — $4,4 \pm 0,5 \times 10^3$ имп/мин на 1×10^7 клеток.

Включение метки спленоцитами в отсутствие LPS и в присутствии 10^{-7} М или 10^{-6} М экдистерона составило $17,8 \pm 0,9$ и $14,7 \pm 1,0$ имп/мин

на 1×10^7 клеток соответственно. Величина же радиоактивности спленоцитов, активированных LPS, равнялась $45,6 \pm 6,0$ имп/мин на 1×10^7 клеток.

Таким образом, экдистерон не вызывает поликлональной активации Т- и В-лимфоцитов.

Учитывая мембранотропный эффект экдистерона [5, 15], мы предположили, что он может оказывать влияние на взаимодействие Кон А с клеточной мембраной. Для выяснения этого вопроса мы исследовали зависимость включения [^3H]тимидина в ДНК Кон А-стимулиро-

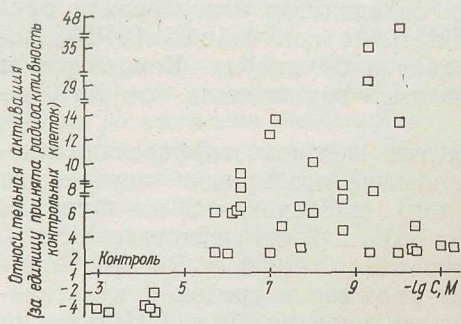


Рис. 1

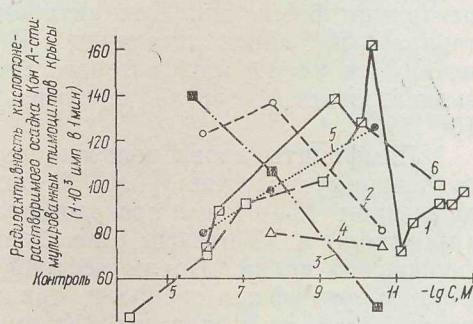


Рис. 2

ванных тимоцитов от последовательности добавления к клеткам Кон А и экдистерона и концентрации последнего в среде культивирования. Согласно таблице, в диапазоне концентраций экдистерона 1×10^{-10} — 5×10^{-7} М радиоактивность клеток, к которым сначала добавлен Кон А, а через 3 ч — экдистерон, достоверно выше либо имеет тенденцию к увеличению по сравнению с радиоактивностью клеток, к которым сначала добавлен экдистерон, а потом Кон А. Вероятно, экдистерон влияет прежде всего на пусковой механизм активации Т-лимфоцитов, вызванной Кон А. При этом практически во всех исследованных случаях экдистерон увеличивает радиоактивность тимоцитов. В последующих экспериментах для достижения более выраженного эффекта в культуру клеток мы всегда добавляли поликлональный митоген, а затем исследуемые экдистероиды.

Как показали исследования, проведенные с использованием первой экспериментальной модели, экдистерон оказывает значительное влияние на биосинтез ДНК в активированных лимфоцитах животных. Из результатов, представленных на рис. 1, видно, что в диапазоне концентраций 10^{-12} — 10^{-6} М экдистерон, как правило, в 2—14 раз увеличивает включение [^3H]тимидина в Кон А-активированные тимоциты. В некоторых опытах экдистерон стимулирует 35—48-кратное увеличение включения метки в ДНК тимоцитов. При повышении его концентрации до 10^{-4} М наблюдается ингибирование активирующего действия Кон А на биосинтез ДНК в тимоцитах.

Полученный при ацилировании экдистерона в пиридине уксусным ангидридом (4 ч, 40°C) 2,3,22-триацетат экдистерона (рис. 2, кр. 5), выделенный путем колоночной хроматографии [9], и препарат БТИ-4 (кр. 6), полученный из растения *Serratula inermis* и содержащий экдистерон в качестве мажорного компонента, а также 1-окси- (интегристерон), 5-окси- (полиподин В) и 26-оксиэкдистерон в качестве минорных компонентов, в соотношениях 1:0, 0,1:0,01:0,0025 [10, 16] так же, как экдистерон (кр. 1), α -экдизон (20-дезоксидэкдистерон) (кр. 2) и их 2-дезоксипроизводные (кр. 3, 4) обладают выраженной стимулирующей активностью на митоген-активированные тимоциты (рис. 2). Сравнительные исследования экдистероидов в одновременных сериях опытов свидетельствуют о несколько более высокой активности α -экдизона и 2-дезоксидэкдистерона в концентрациях 10^{-6} — 10^{-3} М по срав-

нению с эр кулах пяти

Действ сравнивал ты, как из ных этапа лые Т-кле ностных м к кортико

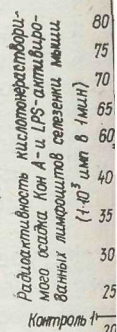


Рис. 3

центраци дина в К по сравн в кислот (кр. 2) и же во вс что в сл синтез Д тимоците Таки ных мож стимуля Под второй в активи цитах м

Вкл А-с экд в ср

Кон в ср

нению с экдистероном, вероятно, связанной с содержанием в их молекулах пятиоксифункций.

Действие экдистерона на Кон А активированные тимоциты мы сравнивали с таковым на Кон А-активированные спленоциты. Тимоциты, как известно, состоят из Т-лимфоцитов, находящихся на начальных этапах дифференцировки, тогда как в селезенке содержатся зрелые Т-клетки. Они отличаются не только различным спектром поверхностных маркеров, но и чувствительностью к гормонам, в частности к кортикостероидам [17]. На рис. 3 показано, что в диапазоне кон-

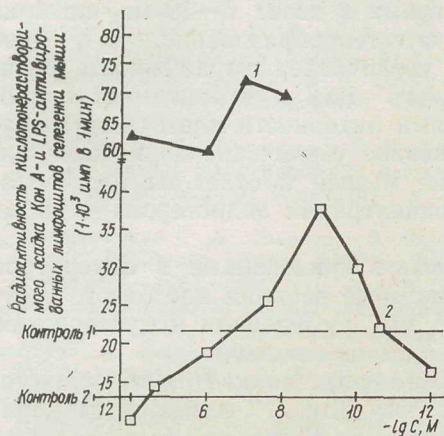


Рис. 3

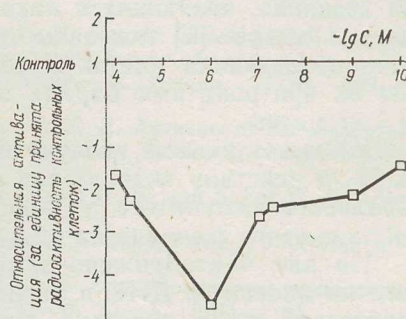


Рис. 4

центраций 10^{-4} — 10^{-8} М экдистерон увеличивает включение $[^3\text{H}]$ тимидина в Кон А-активированные спленоциты мыши (кр. 1) в 3—4 раза по сравнению с контролем. В то же время включение $[^3\text{H}]$ тимидина в кислотонерастворимый осадок LPS-активированных спленоцитов (кр. 2) под влиянием экдистерона в концентрации 10^{-5} — 10^{-12} М также во всех случаях выше, чем в контроле. Следует, однако, отметить, что в случае спленоцитов стимулирующий эффект экдистерона на биосинтез ДНК всегда несколько меньше, чем в случае активированных тимоцитов.

Таким образом, на основании представленных на рис. 1—3 данных можно сделать вывод, что экдистерон вызывает значительную стимуляцию биосинтеза ДНК в тимоцитах и В-лимфоцитах животных.

Подтверждение этого факта мы получили и при использовании второй экспериментальной модели. Так, нами было установлено, что в активированных поликлональными митогенами тимоцитах и спленоцитах мыши, выделенных через 1 ч после введения животным экдисте-

Включение $[^3\text{H}]$ тимидина в кислотонерастворимый осадок Кон А-стимулированных тимоцитов крысы в зависимости от концентрации экдистерона в среде культивирования и последовательности внесения в среду Кон А и экдистерона

Концентрация экдистерона в среде культивирования, М	Радиоактивность кислотонерастворимого осадка Кон А-стимулированных тимоцитов крысы, имп/мин $\times 10^3$ на 1×10^7 клеток	
	экдистерон, 3 ч + Кон А	Кон А, 3 ч + экдистерон
0	4 ± 0,4	4 ± 0,4
1×10^{-10}	55 ± 10	202 ± 26
5×10^{-10}	128 ± 23	154 ± 21
2×10^{-9}	31 ± 5	45 ± 10
1×10^{-8}	23 ± 2	39 ± 7
5×10^{-8}	17 ± 2	—
1×10^{-7}	47 ± 9	53 ± 4
5×10^{-7}	32 ± 8	36 ± 6
1×10^{-6}	22 ± 4	22 ± 5

рона (50 мг/кг массы), включение [³H]тимидина через 72 ч культивирования клеток всегда превышает включение этого радиоактивного предшественника клетками, выделенными из контрольных животных. Так, радиоактивность контрольных и опытных тимоцитов составляет $193,4 \pm 12,9$ и $303,2 \pm 38,4$ имп/мин $\times 10^3$ на 1×10^7 клеток, а контрольных и опытных спленоцитов — $209,9 \pm 17,0$ и $281,2 \pm 34,2$ имп/мин $\times 10^3$ на 1×10^7 клеток соответственно. Ранее [7] показано, что такие дозы экдистерона в опытах *in vivo* ведут к снижению количества антителообразующих клеток в селезенке мышей, слабо влияя на активность Т-клеточного иммунитета. В то же время в дозах 5—10 мг на 1 кг массы тела экдистерон активизирует антителообразование, а в дозе 20 мг на 1 кг массы дополнительно увеличивает выраженность реакций гиперчувствительности замедленного типа и «трансплантат против хозяина», являющихся показателями активности клеточного иммунитета. Авторы [6] показали существенное увеличение количества антителообразующих клеток в селезенке мышей в ответ на иммунизацию их эритроцитами барана при концентрации экдистерона 1—5 мг на 1 кг массы.

Учитывая данные, полученные нами и приведенные в литературе [6, 7], о действии экдистерона на некоторые реакции клеточного и гуморального иммунитета у животных, мы исследовали модулирующее действие этого стероида на иммунную систему человека.

На рис. 4 отображено влияние различных концентраций экдистерона на биосинтез ДНК в активированных Кон А Т-лимфоцитах периферической крови человека, выделенных на Фиколле. Каждая точка на кривой усреднена по шести параллельным пробам. Видно, что экдистерон ингибирует включение [³H]тимидина в Кон А-стимулированные Т-лимфоциты при всех исследуемых концентрациях по сравнению с контрольными клетками. Аналогичный результат получен на поликлонально стимулированных фитогемаглютинином лимфоцитах человека [6]. То есть на лимфоциты периферической крови человека экдистерон действует не так, как на тимоциты животных. Можно предположить, что причиной этого является различный субпопуляционный состав лимфоцитов периферической крови и иммунокомпетентных органов. Кроме того, возможны межвидовые отличия метаболизма этих клеток.

Результаты свидетельствуют о целесообразности исследования действия экдистероидов на биосинтез ДНК в культуре клеток лимфоцитов периферической крови больных различными формами лейкозов.

G. N. Fomovska, A. G. Berdyshev, Yu. D. Kholodova

IMMUNOMODULATORY EFFECT OF ECDYSTEROIDS

Summary

Ecdysterone, its 20-desoxyderivative α -ecdysone, their 2-desoxyderivatives ecdysterone 2, 3, 22-triacetate and preparation ВТI-4 have been studied for their effect on [³H]-thymidine incorporation in different populations of animal and human lymphocytes. It is shown the ecdysterone and its analogs in concentrations of 10^{-12} — 10^{-5} M take considerable stimulating effect on DNA biosynthesis in animal lymphocytes activated by polyclonal mitogenes. The concentration of ecdysterone being increased to 10^{-4} M one can observe complete inhibition of activating effect of polyclonal mitogenes. Effect of the studied ecdysteroids did not considerably depend on their structure.

In case of splenocytes the stimulating effect of ecdysterone on DNA biosynthesis is less expressed than in the case of activated thymocytes. Ecdysterone was established to have considerable inhibiting effect on DNA biosynthesis in the culture of activated Кон А cells of lymphocytes in the peripheral blood of healthy donors.

O. V. Palladin Institute of Biochemistry,
Academy of Sciences, Ukraine;
Institute of Molecular Biology and
Genetics, Academy of Sciences, Ukraine, Kyiv

1. *Ecdysone*. From Chemistry to Mode of Action / Ed. by J. Koolman.— G. Thieme Verlag.— Stuttgart, New York.— 1989.— 325 p.
2. Ахрем А. А., Ковганко Н. В. Экдистероиды // Химия и биологическая активность.— Минск: Наука и техника.— 1989.— 325 с.

3. Koolman J.
4. Миронова
действие ф
Вопр. мед.
5. Холодова
ванные степ
6. Сахибов А.
анализ им
№ 8.— С. 5
7. Кузьмицки
кания имм
токсикол.—
8. Саатов З.,
Химия при
9. Galbraith
хуеecdysone
Р. 1045—1
10. Холодова
ные регул
ний рода
С. 9—17.
11. Колисаре
назы и фе
мунология
12. Selected p
Francisco:
13. Бейум А.
М.: Медиг
14. Джухаров
в экспери
15. Сорочкина
спорта в
Минск.—1
16. Холодова
1987.— №
17. Литвинен
тимидина
идных кр

Ин-т биохим
АН Украины,

удк

Г. X

ОС

ХО

СИ

У Д

В

общего хо
ринемии у
Первый из
ем концен
ся резким
рость нако
риодов на
липопроте
од происх
жающее, е
механисмо
от нормы
неза. В тр
уровня об
бета- и ги

3. Koolman J. Ecdysteroids // Zoological Sci.—1990.—7.— P. 563—580.
4. Миронова В. Н., Холодова Ю. Д., Скачкова Т. Ф. и др. Гипохолестеринемическое действие фитозекдизонов при экспериментальной гиперхолестеринемии у крыс // Вопр. мед. химии.—1982.— № 3.— С. 101—104.
5. Холодова Ю. Д. Фитозекдистероиды — биологически активные полигидроксированные стероиды // Укр. биохим. журн.— 1979.— 51, № 5.— С. 560—575.
6. Сахибов А. Д., Сыров В. И., Усманова А. С., Абакумова О. Ю. Экспериментальный анализ иммуотропного действия фитозекдистероидов // Докл. АН УзССР.— 1989.— № 8.— С. 55—57.
7. Кузьмицкий Б. Б., Голубева М. Б., Конопля И. А. и др. Новые возможности изучения иммуномодуляторов среди соединений стероидной природы // Фармакол. и токсикол.—1990.—53, № 3.— С. 20—22.
8. Саатов З., Усманов Б. З., Абубакиров Н. А. Фитозекдизоны *Silene praemixta* L. // Химия природн. соедин.—1979.— № 6.— С. 793—797.
9. Galbraith M. N., Horn D. N. S. Insect Moulting hormones: crustecdysone (20-hydroxyecdysone) from *Podocarpus elatus* // Australian J. Chem.—1969.—22, N 5.— P. 1045—1057.
10. Холодова Ю. Д., Кляшторная Г. В., Данильченко М. Б. и др. Экологически безопасные регуляторы продуктивности насекомых на основе фитозекдистероидов из растений рода *Serratula* // Химизация и агроэкология.— К.: Изд-во УСХА.—1991.— С. 9—17.
11. Комиссаренко С. В., Уманский В. Ю., Дмитренко Н. П. Активность аденозиндеминазы и ферментов обмена АМР в стимулированных Кон А тимocyтах крыс // Иммунология.—1982.— № 2.— С. 16—18.
12. Selected methods in vellular immunology / Ed. Mishel B. V. and Shiigi S. M.— San Francisco: W. H. Freeman and company.—1980.— P. 4—5.
13. Бейум А. Выделение лимфоцитов, гранулоцитов и макрофагов // Лимфоциты.— М.: Медицина, 1980.— С. 9—19.
14. Джухарова М. Х., Сахибов А. Д., Касымов Б. и др. Фармакокинетика экдистерона в эксперименте // Хим.-фармацевт. журн.— 1984.— № 10.— С. 1163—1167.
15. Сорокина З. А., Холодова Ю. Д. О влиянии экдистерона на процессы полного транспорта в нейронах виноградной улитки // Структурная лабильность мембран.— Минск.—1974.— С. 84—85.
16. Холодова Ю. Д. Фитозекдистероиды // Биохим. животн. и чел.— Респ. межвед. сб.— 1987.— № 11.— С. 27—41.
17. Литвиненко Е. А., Мартыненко Ф. П. Соматотропин повышает скорость включения тимидина в ДНК и аминокислот в белки субпопуляций Д-тимocyтов у гипотиреоидных крыс // Укр. биохим. журн.—1986.—58, № 3.— С. 85—88.

Ин-т биохимии им. А. В. Палладина,
АН Украины, Киев

Получено 18.04.91

УДК 577.125

Г. Х. БОЖКО, В. М. КУЛАБУХОВ, В. П. ВОЛОШИН

ОСОБЛИВОСТІ ЗМІН КОНЦЕНТРАЦІЇ ХОЛЕСТЕРИНУ ТА ФРАКЦІЙ ЛІПОПРОТЕЇНІВ СИРОВАТКИ КРОВИ КРОЛІВ У ДИНАМІЦІ ГІПЕРХОЛЕСТЕРИНЕМІЇ

В результате определения в течение 21 недели концентрации общего холестерина сыворотки крови при моделировании гиперхолестеринемии у кроликов выделено три качественно различных периода. Первый из них заканчивается (4-я неделя) относительным уменьшением концентрации холестерина; второй (4—13-я недели) характеризуется резким ее увеличением; в третьем периоде (13—21-я недели) скорость накопления стерина уменьшается. В каждом из отмеченных периодов наблюдаются колебания концентрации всех основных фракций липопротеинов. Особенности их позволяют судить, что в первый период происходит активирование системы транспорта холестерина, отражающее, возможно, развитие адаптационных гипохолестеринемических механизмов. Второй период может рассматриваться как этап перехода от нормы к патологии и, вероятнее всего, связан с индукцией атерогенеза. В третьем периоде, несмотря на относительную стабилизацию уровня общего холестерина, наблюдаются отчетливые признаки гипер-бета- и гипоальфа-дислиппротеинемий.