

## ВЛИЯНИЕ КОМПЛЕКСОВ $\alpha$ -ФЕТОПРОТЕИНА С АМФИФИЛЬНЫМИ СОЕДИНЕНИЯМИ НА ОСНОВЕ ДОКОЗАГЕКСАЕНОВОЙ КИСЛОТЫ НА ГУМОРАЛЬНЫЙ ИММУННЫЙ ОТВЕТ У МЫШЕЙ ЛИНИИ С57BL/6

Д. В. Арсенов, М. Б. Голубева, М. А. Кисель, Н. А. Конопля, Б. Б. Кузьмицкий, Г. С. Любин, О. А. Стрельченко<sup>1</sup>

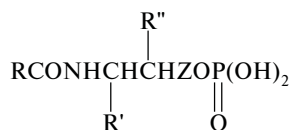
Изучена иммуотропная активность трех производных докозагексаеновой кислоты – N-докозагексаеноил-L-серинфосфата, N-докозагексаеноил L-треонинфосфата и N-докозагексаеноил L-тирозинфосфата в комплексе с высокоочищенным  $\alpha$ -фетопротеином человека. Установлено, что полиеновые соединения указанной природы стимулируют гуморальное звено иммуногенеза у мышей, иммунизированных T-зависимым антигеном (эритроцитами барана). Иммуотропное действие комплексов  $\alpha$ -фетопротеин-лиганд определяется структурой и удельным содержанием в них полиеновых лигандов.

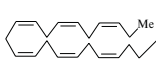

**Ключевые слова:** производные докозагексаеновой кислоты,  $\alpha$ - фетопротеин человека, комплексы  $\alpha$ -фетопротеин-лиганд, иммуотропная активность

### ВВЕДЕНИЕ

Известно терапевтическое действие препаратов, содержащих докозагексаеновую (ДГК) и другие полиеновые жирные кислоты, на моделях аутоиммунных заболеваний — IgA-нефропатии, ревматоидного артрита, системной красной волчанки [5, 7, 8]. Изучение иммуотропной активности высокоочищенного  $\alpha$ -фетопротеина (АФП) человека свидетельствует о наличии у этого эмбрионального белка иммуномодулирующих свойств [1, 3]. Мы предположили, что комплексы АФП с амфифильными соединениями на основе ДГК будут обладать иммуномодулирующей активностью и их действие может быть направлено на восстановление и регуляцию иммунных реакций, включая противоопухолевый иммунитет.

Для проверки предположения были синтезированы анионные мицеллообразующие соединения на основе докозагексаеновой кислоты общей формулы:



R	R'	R''	Z	Соединение
	COOH	H	—	I
	COOH	CH <sub>3</sub>	—	II
	COOH	H		III

В работе использовали  $\alpha$ -фетопротеин, выделенный из ретроплацентарной сыворотки рожеиц по методу, описанному в работе [4].

Растворы комплексов АФП-лиганд I – III готовили непосредственно перед введением, используя маточные растворы чистого АФП (500 мкг в 5 мл воды для инъекций) и соответствующего лиганда (4,2 мг на 2,1 мл воды). Каждый комплекс содержал (из расчета на 1 кг массы тела животного) 450 мкг протеина и 2,28; 4,55 и 6,83 мг одного из лигандов I – III.

### МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Иммуотропную активность соединений изучали в экспериментах на ненаркотизированных мышцах линии С57BL/6 массой 18 – 22 г, полученных из питомника отдела биоиспытаний ИБОХ НАН Беларуси и содержащихся в стандартных условиях вивария.

Гуморальный иммунный ответ оценивали по изменению уровня антителообразующих клеток (АОК) в реакции первичного иммунного ответа (ПИО) [6]. Мышей иммунизировали эритроцитами барана (ЭБ), отмытыми в растворе Хенкса (внутрибрюшинно,  $5 \cdot 10^7$  клеток на мыш). Величину иммунного ответа оценивали по числу АОК в селезенке животных на 5-й день после иммунизации антигеном. Параллельно определяли содержание гемагглютинирующих антител в сыворотке периферической крови согласно общепринятому методу [2].

Растворы комплексов и лигандов в 0,9% растворе NaCl вводили в день иммунизации внутривенно однократно в объеме 0,2 мл на мыш. Свободные лиганды вводили в дозе 6,8 мг/кг, в комплексах с АФП лиганды вводили в дозах 2,3; 4,6 и 6,8 мг/кг массы тела животного.

Результаты экспериментов обрабатывали с помощью методов математической статистики и оценивали по *t*-критерию Стьюдента.

<sup>1</sup> Институт биоорганической химии НАН Беларуси, Минск, 220141, ул. Акад. В. Ф. Купревича, 5/2.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Все изученные соединения активировали гуморальное звено иммунитета, что проявляется увеличением содержания АОК в селезенке иммунизированных мышей (таблица). Наибольший активирующий эффект по тесту ПИО к ЭБ зарегистрирован в случае введения лиганда I, увеличивающего относительное и абсолютное содержание АОК в селезенке иммунизированных животных на 138 и 159% соответственно. Существенным иммуностимулирующим потенциалом обладает и соединение III, вызывающее более чем двукратное приращение количества антителопродукторов у мышей. Что касается воздействия лиганда II на развитие ответной иммунной реакции гуморального типа, то здесь обращает на себя внимание преимущественное увеличение абсолютного (159%) по сравнению с приростом относительного (67%) содержания антитело-

родуцирующих клеток. Это свидетельствует о стимуляции прежде всего клеточности селезенки и в значительно меньшей степени — специфических IgM-синтезирующих АОК. Таким образом, выбор соединений на основе ДГК в качестве элементов, образующих комплексы АФП-лиганд, оправдан.

Введение АФП не вызвало существенных изменений в относительном и абсолютном содержании антителопродукторов в селезенке иммунизированных мышей, что свидетельствует о том, что в указанных условиях эксперимента АФП является иммунонейтральным веществом. Полученные результаты согласуются с литературными данными [9].

Эксперименты показали, что иммунологическая активность исследуемых соединений и АФП определяется пропорцией между содержанием полиенового лиганда и таковым белка: возрастание доли лиганда сопровождается существенными изменениями иммуно-

**Влияние комплексов  $\alpha$ -фетопротейн(АФП)-лиганд I – III и свободных лигандов на количество антителообразующих клеток (АОК) в селезенке и титры гемагглютининов у мышей линии C57BL/6, иммунизированных эритроцитами барана ( $5 \cdot 10^7$  клеток на мышь внутривенно)**

Группа животных	Доза, мг/кг в/в	Количество АОК на $10^6$ спленоцитов	% эффекта	Количество АОК на селезенку, $\cdot 10^3$	% эффекта	Индекс селезенки	% эффекта	Титры гемагглютининов	% эффекта
Контроль АФП	–	799,3 $\pm$ 63,3	–	101,1 $\pm$ 8,6	–	6,5 $\pm$ 0,6	–	8,30 $\pm$ 0,30	–
	0,45	740,4 $\pm$ 77,1	7 <i>p</i> > 0,05	85,3 $\pm$ 3,8	15 <i>p</i> > 0,05	5,5 $\pm$ 0,3	15 <i>p</i> > 0,05	7,80 $\pm$ 0,40	6 <i>p</i> > 0,05
Контроль АФП-I	–	273,3 $\pm$ 20,4	–	31,3 $\pm$ 2,5	–	5,9 $\pm$ 0,5	–	7,00 $\pm$ 0,40	–
	2,3	645,4 $\pm$ 27,7	136 <i>p</i> < 0,001	72,4 $\pm$ 6,1	131 <i>p</i> < 0,001	6,6 $\pm$ 0,3	12 <i>p</i> > 0,05	8,50 $\pm$ 0,30	21 <i>p</i> < 0,05
	4,6	513,6 $\pm$ 89,9	88 <i>p</i> < 0,05	55,9 $\pm$ 9,6	79 <i>p</i> < 0,05	6,6 $\pm$ 0,4	12 <i>p</i> > 0,05	7,80 $\pm$ 0,30	11 <i>p</i> > 0,05
	6,8	340,9 $\pm$ 46,6	25 <i>p</i> > 0,05	49,1 $\pm$ 5,7	57 <i>p</i> < 0,05	6,9 $\pm$ 0,2	17 <i>p</i> > 0,05	7,80 $\pm$ 0,30	11 <i>p</i> > 0,05
I	6,8	651,6 $\pm$ 48,2	138 <i>p</i> < 0,001	81,1 $\pm$ 5,8	159 <i>p</i> < 0,001	6,7 $\pm$ 0,2	14 <i>p</i> > 0,05	8,50 $\pm$ 0,30	21 <i>p</i> < 0,05
Контроль АФП-II	–	266,4 $\pm$ 21,5	–	30,0 $\pm$ 2,5	–	6,5 $\pm$ 0,6	–	8,30 $\pm$ 0,30	–
	2,3	233,3 $\pm$ 35,4	12 <i>p</i> > 0,05	26,3 $\pm$ 4,1	12 <i>p</i> > 0,05	6,2 $\pm$ 0,2	5 <i>p</i> > 0,05	8,30 $\pm$ 0,30	0 –
	4,6	298,4 $\pm$ 29,9	12 <i>p</i> > 0,05	29,1 $\pm$ 3,7	3 <i>p</i> > 0,05	6,9 $\pm$ 0,5	3 <i>p</i> > 0,05	8,00 $\pm$ 0,50	4 <i>p</i> > 0,05
	6,8	348,9 $\pm$ 30,3	31 <i>p</i> < 0,05	35,7 $\pm$ 4,1	19 <i>p</i> < 0,05	6,5 $\pm$ 0,4	0 –	8,80 $\pm$ 0,50	6 <i>p</i> > 0,05
II	6,8	445,4 $\pm$ 39,9	67 <i>p</i> < 0,01	77,7 $\pm$ 6,2	159 <i>p</i> < 0,001	7,5 $\pm$ 0,4	15 <i>p</i> > 0,05	9,30 $\pm$ 0,20	12 <i>p</i> < 0,05
Контроль АФП-III	–	291,1 $\pm$ 14,3	–	35,0 $\pm$ 3,3	–	6,2 $\pm$ 0,5	–	7,20 $\pm$ 0,30	–
	2,3	263,8 $\pm$ 23,6	9 <i>p</i> > 0,05	27,8 $\pm$ 2,8	21 <i>p</i> > 0,05	6,3 $\pm$ 0,3	2 <i>p</i> > 0,05	7,40 $\pm$ 0,30	3 <i>p</i> > 0,05
	4,6	509,8 $\pm$ 30,9	75 <i>p</i> < 0,002	46,4 $\pm$ 2,9	33 <i>p</i> < 0,05	5,9 $\pm$ 0,3	5 <i>p</i> > 0,05	7,40 $\pm$ 0,30	3 <i>p</i> > 0,05
	6,8	418,3 $\pm$ 49,7	44 <i>p</i> < 0,05	36,1 $\pm$ 5,6	3 <i>p</i> > 0,05	6,1 $\pm$ 0,4	2 <i>p</i> > 0,05	7,60 $\pm$ 0,40	6 <i>p</i> > 0,05
III	6,8	682,6 $\pm$ 33,3	135 <i>p</i> < 0,001	69,6 $\pm$ 6,0	99 <i>p</i> < 0,01	6,3 $\pm$ 0,4	2 <i>p</i> > 0,05	7,80 $\pm$ 0,30	8 <i>p</i> > 0,05

позитивного потенциала комплексов. Так, в случае инъекции комплекса АФП-I эти изменения выражаются в снижении стимуляции накопления АОК со 136% (при минимальной дозе полиенового лиганда, введенного внутривенно в составе комплекса) до уровня лишь тенденции (25%;  $p > 0,05$ ), регистрируемой после введения комплекса с максимальным содержанием лиганда.

Введение комплекса АФП-II с минимальным содержанием соответствующего полиенового лиганда не вызывает изменений регистрируемых параметров гуморального иммунитета, тогда как двукратное увеличение дозы лиганда позволило достигнуть приращенного относительного содержания АОК только на уровне тенденции (12%;  $p > 0,05$ ). Дальнейшее возрастание содержания лиганда в составе комплекса до 6,8 мг/кг позволило достичь прироста относительного уровня антителопродукторов (31%;  $p < 0,05$ ), хотя показатель абсолютного количества АОК в селезенке не превысил порога достоверного различия (19%;  $p > 0,05$ ).

Как и в случае с комплексом АФП-II, введение комплекса АФП-III с минимальным содержанием лиганда не влияет на развитие ответной иммунной реакции гуморального типа. Однако при дозе лиганда III, равной 4,8 мг/кг, иммунопозитивное действие комплекса достигает максимума (75%,  $p < 0,002$ ) и снижается до 44% ( $p < 0,05$ ) в случае введения комплекса с наибольшим содержанием лиганда.

## ВЫВОДЫ

1. Экзогенные полиеновые соединения, полученные на основе докозагексаеновой кислоты, при введении в

дозе 6,8 мг/кг внутривенно стимулируют накопление IgM-секретирующих антителопродукторов в селезенке мышей линии C57BL/6, иммунизированных эритроцитами барана.

2. Неоднозначный характер зависимости между иммуотропным действием комплексов АФП ( $\alpha$ -фетопротейн)-лиганд I – III и удельным содержанием в них лигандов определяется различиями в структуре последних. Для проявления комплексом АФП-лиганд наиболее выраженного иммуностимулирующего эффекта предпочтительно наличие остатка L-серина (I), но не L-тирозина (II) или L-треонина (III), в структуре N-докозагексаноильного производного.

## ЛИТЕРАТУРА

1. И. А. Аутеншлюс, А. И. Иванова, В. М. Столярова и др., *Сб. тр., I нац. конф. Рос. ассоц. клин. иммунол. и иммунофармакол.*, Москва (1997), 638.
2. Э. Зигль, *Иммунологические методы*, Москва (1979), сс. 108 – 112.
3. И. Г. Сидорович, Л. С. Сеславина, Г. О. Гудима, *Сб. тр., I нац. конф. Рос. ассоц. клин. иммунол. и иммунофармакол.*, Москва (1997), с. 317.
4. Л. И. Сурвило, И. И. Вашкевич, М. Н. Ермоленко и др., *Весті НАН Беларусі, сер. хім. навук*, № 2, 81 – 85 (2000).
5. U. Barcelli, and V. E. Pollak, *Nephron*, **41**(3), 209 – 212 (1985).
6. A. J. Cunningham, *Nature*, **207**(5001), 1106 – 1107 (1965).
7. V. E. Kelly, A. Firetti, S. Yzui, and T. Strom, *J. Immunol.*, **134**(3), 1914 – 1919 (1985).
8. C. A. Leslie, W. A. Gonnerman, M. D. Ullman, et al., *J. Exp. Med.*, **162**(10), 1336 – 1349 (1985).
9. S. Sell, H. V. Sheppard Jr., and M. Poler, *J. Immunol.*, **119**(1), 98 – 103 (1977).

Поступила 05.04.2001

## THE EFFECT OF $\alpha$ -FETOPROTEIN COMPLEXES WITH DOCOSAHEXAENIC ACID BASED AMPHIPHILIC COMPOUNDS ON THE HUMORAL IMMUNE RESPONSE IN C57BL/6 MICE

D. V. Arsenov, M. B. Golubeva, M. A. Kisel', N. A. Konoplya, B. B. Kuz'mitskii, G. S. Lyubin, O. A. Strel'chenok

Institute of Bioorganic Chemistry, National Academy of Sciences of Belarus, ul. Akademika Kuprevicha 5/2, Minsk, 220141 Belarus

The immunotropic activity of three derivatives of docosahexaenic acid (N-docosahexaenoyl-L-serine phosphate, N-docosahexaenoyl-L-threonine phosphate, and N-docosahexaenoyl-L-tyrosine phosphate) in complexes with high-purity human  $\alpha$ -fetoprotein was evaluated. The polyene compounds stimulate the humoral immunity in mice immunized with T-dependent antigen (ram red blood cells). The immunotropic activity of the  $\alpha$ -fetoprotein – ligand complexes studied depends on the structure and the content of polyene ligands.