

А. В. Козлов, З. Ю. Ткачук,  
И. И. Слуквин, В. П. Чернышев, И. А. Михайлопуло

## ВЛИЯНИЕ 2', 5'-ОЛИГОАДЕНИЛАТОВ НА НЕКОТОРЫЕ ПОКАЗАТЕЛИ ИММУННОГО ОТВЕТА

*В работе изучали иммунологические свойства различных 2',5'-олигоаденилатов. Показано, что некоторым коровым тримерам 2',5'-олигоаденилатов присуще иммуностимулирующее действие, тогда как его эпоксипроизводное имеет выраженный иммуносупрессивный характер. Эффекты эти проявляются как в экспериментах *in vitro*, так и *in vivo*.*

**Введение.** Известно, что один из путей действия интерферона, так называемый «олигоаденилатный путь», заключается в активации интерфероном особого фермента — 2',5'-олигоаденилатсинтетазы. Последний, в свою очередь, из внутриклеточного, пулового АТФ синтезирует особый класс соединений — 2',5'-олигоА<sub>n</sub> ( $n=2-6$ , но чаще встречаются трехчленные соединения), которые в дальнейшем активируют латентную РНКазу L, гидролизующую вирусные и мРНК [1]. Способностью индуцировать данный фермент обладают только фосфорилированные олигоаденилаты, и аффинность олигоаденилата к ферменту возрастает с увеличением количества фосфатных групп олигоА [2]. Затем под действием фосфодиэстераз олигоаденилат гидролизуется с образованием аденозина и АМФ. Следовательно, в описанной схеме биологическая активность и, в первую очередь, противовирусная и антипролиферативная связана с воздействием на мРНК и ингибированием трансляции [1]. Вышеприведенная схема характерна только для фосфорилированных олигоаденилатов, так как дефосфорилированные или коровые олигоаденилаты не связываются и не активируют РНКазу L [2]. Коровые олигоаденилаты также отличаются противовирусной активностью, причем не только к РНК-, но к ДНК-содержащим вирусам [3]. На активность олигоаденилатов в значительной степени влияет их структура. Так, исходный коровый олигоаденилат 2',5'-АрАрА довольно быстро разрушается фосфодиэстеразами, тогда как некоторые его химически модифицированные аналоги более стабильны и обладают более выраженными биологическими эффектами [4].

Так как действие олигоаденилатов связано с действием интерферона, то логичным продолжением предыдущих исследований было бы изучение влияния их на иммунную систему. В настоящей работе была предпринята попытка анализа возможности воздействия коровых олигоаденилатов как *in vitro*, так и *in vivo* на иммунокомпетентные клетки.

**Материалы и методы.** В качестве исследуемых препаратов в работе использовали различные 2',5'-олигоаденилаты, синтезированные в Ин-те биоорг. химии АН Беларуси, среди которых: 2',5'-АрА, 2',5'-АрАрА, 2',5'-АрАрАрА, 3',5'-АрАрА, АМР, аденозин, а также эпоксипроизводное исходного корового тримера 2',5'-АрАрероХуА.

Все препараты предварительно оценивали с помощью обращенно-фазовой хроматографии (ВЭЖХ), и если чистота их была менее 98—99 %, то препараты доочищали. Для исследования гиперчувствительности замедленного типа (ГЗТ) использовали мышей линии С57ВL — самцов массой 16—20 г. Животных сенсibilizировали под кожу лопаточной области эритроцитами барана в дозе  $1 \cdot 10^7$ . Одновременно в ту

© А. В. КОЗЛОВ, З. Ю. ТКАЧУК, И. И. СЛУКВИН, В. П. ЧЕРНЫШЕВ,  
И. А. МИХАЙЛОПУЛО, 1994

же область мышам опытных групп вводили 0,05 мл полного адьюванта Фрейнда («Calbiochem», США) или различные концентрации исследуемых олигоаденилатов. На 5—6-е сут после сенсibilизации вводили в подушечку задней правой лапки  $2 \cdot 10^7$  эритроцитов барана в объеме 0,05 мл, в левую (контрольную) лапку вводили в том же объеме физиологический раствор. Реакцию оценивали по массе задних опытных и контрольных лапок через 1 сут после инъекции. Индекс реакции вычисляли по формуле

$$\frac{P_o - P_k}{P_k} \cdot 100 \%,$$

где  $P_o$  и  $P_k$  — масса опытной и контрольной лапок соответственно.

Реакцию бласттрансформации лимфоцитов проводили по общепринятым методикам [5]. Лимфоциты получали из селезенки мышей линии С57ВL и культивировали в среде RPMI 1640 при 37 °С в пластиковых планшетах в  $\text{CO}_2$ -инкубаторе при 5 %-м содержании газа. Исходная концентрация клеток составляла  $5 \cdot 10^6$  кл/мл. В каждую лунку вносили по 0,1 мл клеточной суспензии и среды RPMI 1640 с митогенами. Конечная концентрация ConA составляла 10 и 20 мкг/мл, ФГА — 20 и 30 мкг/мл. Планшеты помещали в  $\text{CO}_2$ -инкубатор при 37 °С на 48 ч. За 16 ч до окончания инкубации к клеточной суспензии добавляли  $^3\text{H}$ -тимидин с активностью 3,7 кБк/мл. После 16 ч инкубации клеток с радиоактивной меткой планшеты помещали на лед. В каждой лунке клетки суспендировали и переносили на фильтры GF/C, предварительно закрепленные на установке для вакуумного фильтрования. Фильтры тщательно промывали средой 199 для удаления не связанной с клетками метки и 5 %-й ТХУ кислотой. После осаждения кислотой фильтры промывали 5 мл изотонического раствора хлорида натрия и 5 мл 96 %-го раствора этанола. Затем фильтры высушивали и измеряли радиоактивность на спектрометре во флаконах с сцинтилляционной жидкостью. Кроме того, реакцию бласттрансформации лимфоцитов проводили с помощью морфологического анализа клеток. В данном случае препарат эпоксипроизводного вводили внутривенно макакам резус в концентрации 50 мкг/кг.

Опытная группа состояла из четырех животных. Через 24 ч после введения препарата брали кровь из вены и центрифугированием в градиенте фиколл/верографин выделяли лимфоциты. Клетки лимфоцитов переводили в культуру и культивировали способом, аналогичным описанному выше для ConA. Через 24 ч клетки из лунок отбирали и наносили на предметные стекла. Полученные мазки окрашивали красителем Романовского — Гимза в течение 20 мин и проводили морфологический анализ. В каждом образце подсчитывали общее количество лимфоцитов, blastоподобные формы, бласты и митозы.

Клеточный цикл клеток мышинных фибробластов определяли с помощью проточной цитофлуориметрии на установке FACS II («Becton Dickinson»). После инкубации с препаратом (2',5'-ArArA) клетки суспендировали в окрашивающем буфере следующего состава: 0,1 %-й цитрат натрия, 1 %-й нонидет Р40, 10 мкг/мл бромистого этидия и 40 мкг/мл РНКазы.

**Результаты и обсуждение.** Реакция ГЗТ — клеточно-опосредованный иммунологический способ повышенного реагирования на чужеродные вещества. Состояние ГЗТ формируется при многих инфекционных заболеваниях вирусной, бактериальной, грибковой природы и определяется при аутоаллергических и других патологических состояниях. Интенсивность развития реакции зависит от степени сенсibilизации организма, которая, в свою очередь, обусловлена физико-химическими свойствами антигена, дозой, кратностью и способом введения. Выраженность реакции ГЗТ в ответ на введение олигоаденилатов зависит как от концентрации препаратов, так и от их химической структуры. В клетках в ответ на интерферон образуются олигоаденилаты с различным содержанием адениловых звеньев. В представленной работе исследова-

ли влияние на уровень реакции ГЗТ некоторых олигоаденилатов с различным содержанием адениловых звеньев (2',5'-АрА, 2',5'-АрАрА, 2',5'-АрАрАрА).

Показано, что при введении препаратов олигоаденилатов в концентрации 0,005 мг/кг наибольшим иммуностимулирующим эффектом обладает трехчленный олигоаденилат (индекс реакции  $7,8 \pm 0,8$ ), причем эффект этот выше действия адьюванта (индекс  $6,7 \pm 0,6$ ), тогда как четырехчленный препарат практически не оказывает какого-либо заметного воздействия (табл. 1). Двухчленный олигоаденилат имеет эффект, соизмеримый с действием адьюванта и АМФ. АМФ и аденозин взяты в качестве маркеров в связи с тем, что именно эти соединения являются продуктами ферментативного гидролиза 2',5'-олигоаденилата [6] и, возможно, получаемый эффект в реакции ГЗТ связан с их действием. В экспериментах (табл. 1) было показано, что аденозин практически не влияет на уровень реакции ГЗТ (индекс  $4,9 \pm 1,4$ ), тогда как АМФ свойствен эффект, сопоставимый с адьювантом (индекс реакции адьюванта 6,7, индекс реакции АМФ 6,4). Есть данные о том [7], что именно АМФ, в отличие от других мононуклеотидов, обладает наиболее выраженным действием на формирование реакции ГЗТ.

Таблица 1

Уровень формирования ГЗТ у мышей при введении различных олигоаденилатов

| Препарат      | Концентрация препарата, мг/кг | Индекс реакции, % |
|---------------|-------------------------------|-------------------|
| Контроль      | —                             | $4,7 \pm 1,1$     |
| Адьювант      | 0,5 мл                        | $6,7 \pm 0,6$     |
| 2',5'-АрАрА   | 0,005                         | $7,8 \pm 0,8$     |
| 2',5'-АрАрАрА | 0,005                         | $4,2 \pm 1,4$     |
| 2',5'-АрА     | 0,005                         | $6,3 \pm 1,2$     |
| 3',5'-АрАрА   | 0,005                         | $5,4 \pm 0,9$     |
| АМФ           | 0,01                          | $6,4 \pm 0,7$     |
| Аденозин      | 0,01                          | $4,9 \pm 1,4$     |

Таблица 2

Уровень формирования ГЗТ под воздействием 2',5'-АрАрА

| Препарат    | Концентрация препарата, мг/кг | Индекс реакции, % |
|-------------|-------------------------------|-------------------|
| Контроль    | —                             | $4,3 \pm 0,9$     |
| Адьювант    | 0,5 мл                        | $8,8 \pm 1,0$     |
| 2',5'-АрАрА | 0,005                         | $9,4 \pm 1,2$     |
| 2',5'-АрАрА | 0,05                          | $3,6 \pm 0,5$     |
| 2',5'-АрАрА | 0,5                           | $3,5 \pm 0,7$     |

Наряду с олигоаденилатами, имеющими 2'-связь, существуют и их аналоги с 3'-связью. Данные соединения также изучали для выявления их способности влиять на реакцию ГЗТ.

Показано, что 3',5'-олигоаденилату, в отличие от 2',5'-структуры, не присуще заметное стимулирующее действие, что, по-видимому, связано с его мгновенным гидролизом в клетках до АМФ и аденозина или с активным воздействием на иммунокомпетентные клетки. Выраженность реакции ГЗТ зависит и от концентрации вводимого 2',5'-олигоаденилата. Исследования показали, что наибольший эффект наблюдается при концентрации 0,05 мг/кг. В этом случае индекс реакции составляет 9,4 %, тогда как сам адьювант при оптимальной концентрации дает более низкие значения индекса реакции ГЗТ (8,8 %). Меньшая доза (0,005 мг/кг) не вызывает значительного увеличения индекса реакции, тогда как доза 0,5 мг/кг сопровождается даже снижением показателей индекса реакции ГЗТ (табл. 2), и в данном случае препарат проявляет свойства иммуносу-

Таблица 3

Уровень формирования ГЗТ у мышей при введении эпоксипроизводного 2',5'-аденилата (2',5'-АрАрерохуА)

| Препарат                    | Концентрация препарата, мг/кг | Индекс реакции, % |
|-----------------------------|-------------------------------|-------------------|
| Контроль                    | —                             | $4,2 \pm 0,8$     |
| Адьювант                    | 0,5 мл                        | $7,2 \pm 1,4$     |
| 2',5'-АрАрерохуА            | 0,005                         | $5,4 \pm 2,1$     |
| 2',5'-АрАрерохуА            | 0,05                          | $2,1 \pm 0,6$     |
| 2',5'-АрАрерохуА            | 0,5                           | $1,2 \pm 0,4$     |
| ТиоТЭФ                      | 10                            | $1,9 \pm 0,7$     |
| Адьювант + 2',5'-АрАрерохуА | $0,05 \pm 0,5$ мл             | $4,6 \pm 2,1$     |

прессии. Меньшая доза (0,005 мг/кг) не вызывает значительного увеличения индекса реакции, тогда как доза 0,5 мг/кг сопровождается даже снижением показателей индекса реакции ГЗТ (табл. 2), и в данном случае препарат проявляет свойства иммуносу-

прессора. Использование химически модифицированного аналога олигоаденилата (2',5'-АрАрероуА), наоборот, ведет к ингибированию реакции ГЗТ при четко выраженной концентрационной зависимости (табл. 3). Эффект ингибирования реакции ГЗТ данным олигоаденилатом соизмерим с действием такого цитостатика, как тиофосфамид (табл. 3). Кроме того, при совместном введении эпоксипроизводного и адьюванта нейтрализуется стимулирующий эффект последнего. Другие химически модифицированные аналоги 2',5'-олигоаденилатов (ксило- и ага-производные) не обладают столь выраженным супрессивным действием.

Следовательно, природный трехчленный коровый олигоаденилат обладает иммуностимулирующими свойствами, тогда как для его аналога с модификацией в третьем члене олигоаденилата — эпоксипроизводного — характерны иммуносупрессивные свойства и он может быть использован при лечении аутоиммунных заболеваний и при трансплантациях. Активное участие в формировании реакции ГЗТ принимают Т-клетки и, в первую очередь, Т-хелперы и Т-супрессоры. Таким образом, можно предположить, что клетками-мишенями для некоторых олигоаденилатов являются Т-клетки.

Из изложенных выше результатов следует, что, возможно, повышенная интенсивность реакции ГЗТ связана именно со структурой 2',5'-АрАрА и его аналогов. На это указывают данные индекса реакции ГЗТ вероятных продуктов метаболизма природного кора. Так, было показано, что при гидролизе олигоаденилата выявляются следующие продукты: аденозин, АМФ и двухчленный кор — 2',5'-АрА. Данные соединения могут несколько повышать индекс реакции ГЗТ, но в меньшей степени, чем 2',5'-АрАрА (табл. 1). С другой стороны, важно отметить, что некоторые более стабильные к действию ферментов формы обладают выраженными иммуносупрессивными и антиаллергическими свойствами.

Для оценки функциональной активности лимфоцитов исследовали влияние анализируемых препаратов на реакцию бласттрансформации.

Бласттрансформация — это переход малых лимфоцитов из состояния покоя в бластные формы, способные к пролиферации и дальнейшей дифференцировке. Процесс этот сопровождается морфологическими изменениями: увеличением размеров клеток, количества митохондрий, рибосом и др. Формы, характеризующие процесс трансформации лимфоцитов в клетки бластов, различаются морфологически и представлены переходными бластоподобными и бластными клетками. Бласттрансформацию лимфоцитов чаще всего индуцируют митогенами. В качестве последних используют различные лектиновые соединения. Митогены могут проявлять свою активность как в отношении Т-, так и В-лимфоцитов. Так, СопА и фитогемагглютинин (ФГА) являются митогенами для Т-лимфоцитов, а липополисахарид (ЛПС) — для В-лимфоцитов. В культуре лимфоцитов *in vitro* митогены приводят к синтезу РНК, белка и образованию бластов через 1—2 ч после контакта клеток с митогеном, а через 24 ч клетка приступает к митозу.

Способность к бласттрансформации отражает функциональную активность иммунокомпетентных клеток, а реакция бласттрансформации, являясь надежным тестом определения иммунологической реактивности, может быть использована для оценки иммунологического статуса организма.

В настоящей работе реакцию бласттрансформации оценивали как с помощью морфологического анализа, так и по включению радиоактивной метки (<sup>3</sup>H-тимидин). В наших опытах в качестве митогенов использовали СопА, ФГА и ЛПС. Эксперименты проводили на культуре клеток лимфоцитов, выделенных из селезенки мышей и крови обезьян после введения препаратов.

Исследования показали, что исходный коровый трехчленный олигоаденилат в диапазоне определенных концентраций снижает уровень реакции бласттрансформации (табл. 4). В то же время инкубация кле-

ток лимфоцитов с олигоаденилатом и без добавления митогенов (спонтанная бласттрансформация) приводит к увеличению клеточного деления. Следовательно, можно предположить, что исходный коровый трехчленный олигоаденилат при определенных концентрациях ( $10^{-6}$ — $10^{-5}$  М) проявляет слабые митогенные свойства, но только при отсутствии более сильных митогенов.

Таблица 4

Влияние 2',5'-олигоаденилатов на уровень реакции бласттрансформации лимфоцитов

| 2',5'-лигоА      | Митоген    | Контроль     | Концентрация 2',5'-олигоА, моль/л |              |              |
|------------------|------------|--------------|-----------------------------------|--------------|--------------|
|                  |            |              | $10^{-3}$                         | $10^{-6}$    | $10^{-8}$    |
| 2',5'-АрАрероухА | СопА       | 5428±432,2   | 1599±741                          | 1733,6±486   | 3865,5±648   |
| 2',5'-АрАрА      | СопА       | 5108,8±92,4  | 1355,5±42,1                       | 2237,8±236,3 | 6915,2±508,6 |
| 2',5'-АрАрероухА | ЛПС        | 3480,1±381,4 | 1089,7±268,1                      | 3087,2±448,8 | 3335,5±282,1 |
| 2',5'-АрАрА      | ЛПС        | 4281,3±542,2 | 1525±225,4                        | 1555±364,3   | 3526,7±118,2 |
| 2',5'-АрАрА      | Спонтанная | 2280,5±164,7 | 2087,2±316,2                      | 2642,9±237,1 | 3337,3±114,3 |

Таблица 5

Количественный анализ бластоидных клеток при стимуляции лимфоцитов периферической крови обезьян макак резус инв. № 22045 СопА до (контроль) и через 24 ч после повторного введения животному внутривенно препарата № 16 эпокси (опыт: доза препарата 55 мг/кг)

| Вариант                              | Всего проанализировано клеток (абс.) | В том числе                        |                     |                    |                     |                   |
|--------------------------------------|--------------------------------------|------------------------------------|---------------------|--------------------|---------------------|-------------------|
|                                      |                                      | не трансформированные лимфоциты, % | бластоидные клетки  |                    |                     | митозы, %         |
|                                      |                                      |                                    | мелкие и средние, % | крупные, %         | всего, %            |                   |
| Контрольный                          | 3471                                 | 22,41±0,7                          | 50,67±0,8           | 20,45±0,6          | 71,13±0,7           | 6,45±0,4          |
| Через 24 ч после повторного введения | 2023                                 | 17,31±0,8                          | 69,44±1,0           | 13,49±0,7          | 84,28±0,8           | 0                 |
| Достоверность                        |                                      | t=4,7;<br>P<0,001                  | t=14,2;<br>P<0,001  | t=6,96;<br>P<0,001 | t=11,95;<br>P<0,001 | t=15,3<br>P<0,001 |

В экспериментах *in vitro* 2',5'-АрАрероухА также обладает выраженным ингибирующим эффектом в довольно значительном диапазоне концентраций (табл. 4). При морфологическом анализе реакции бласттрансформации лимфоцитов, выделенных из крови обезьян после введения препарата, эпоксипроизводное также значительно ингибирует реакцию бласттрансформации.

Таблица 6

Влияние 2',5'-АрАрА на митотический цикл клеток мышинных фибробластов

| Концентрация, моль/л | Фаза клеточного цикла | Клетки, % |
|----------------------|-----------------------|-----------|
| Контроль             | G <sub>1</sub>        | 68        |
|                      | S                     | 30        |
|                      | G <sub>2</sub> +M     | 3         |
| 10 <sup>-6</sup>     | G <sub>1</sub>        | 44        |
|                      | S                     | 49        |
|                      | G <sub>2</sub> +M     | 7         |
| 10 <sup>-3</sup>     | G <sub>1</sub>        | 71        |
|                      | S                     | 11        |
|                      | G <sub>2</sub> +M     | 12        |

Процент бластоидных клеток, особенно крупных бластов, в культуре клеток достоверно снизился по сравнению с таковыми в контрольной группе (табл. 5). Таким образом, олигоаденилаты и особенно эпоксипроизводное обладают выраженным иммуносупрессивным действием.

Как уже отмечалось выше, 2',5'-олигоаденилаты могут, по-видимому, влиять и на митотическую функцию клеток. Для этого исследовали реакцию клеточного цикла мышинных фибробластов в ответ на действие олигоаденилата.

В табл. 6 представлены данные по распределению клеток в различных фазах клеточного цикла. При концентрации клеток  $10^{-3}$  М 2',5'-АрАрА выступает как антимиоген, а при понижении концентрации до  $10^{-6}$  М препарату характерны митогенные свойства. Скорее всего, это может объяснить тот факт, что в присутствии митогенов

происходит супрессия РБТЛ, тогда как без добавления CopA или ФГА роль митогена выполняет сам олигоаденилат.

Следовательно, олигоаденилаты и прежде всего эпоксипроизводное обладают значительными супрессивными свойствами. Ранее [8] было показано также, что природному коровому трехчленному олигоаденилату свойственно ингибирующее влияние на реакцию бласттрансформации, и авторы предложили данный препарат как иммуносупрессор при операциях по трансплантации органов, однако они не изучали супрессивную активность аналогов 2',5'-олигоаденилатов.

О. В. Козлов, З. Ю. Ткачук, І. І. Слуквін, В. П. Чернишов, І. А. Михайлопуло

## ВПЛИВ 2',5'-ОЛИГОАДЕНИЛАТІВ НА ДЕЯКІ ПОКАЗНИКИ ІМУННОЇ ВІДПОВІДІ

### Резюме

В роботі вивчено імунологічні властивості різних 2',5'-олигоаденилатів. Показано, що деяким коровим тримерам 2',5'-олигоаденилатів притаманна імуностимулююча дія, тоді як їх епоксипохідне має виражений імуносупресивний характер. Ефекти ці проявляються в експериментах як *in vitro*, так і *in vivo*.

A. V. Kozlov, Z. Yu. Tkachuk, I. I. Slukvin, V. P. Tchernyshev, I. A. Mikhailopulo

## 2',5'-OLIGOADENYLATES EFFECT ON CERTAIN INDEXES OF IMMUNE RESPONSE

### Summary

Immunologic characteristics of different 2',5'-oligoadenylates were studied. It was shown that some core trimers of 2',5'-oligoadenylates have immunostimulative qualities while its epoxy-derivative has expressed immunosuppressive character. These effects were obtained both *in vitro* and *in vivo* experiments.

## СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Pauwels R., De Clercq E., Balzarini F. Biological activity of new 2-5A analogues // *Chemica Scripta*.—1986.—26, N 2.—P. 141—145.
2. Torrence P. F., Brozda D., Alster D. et al. Only one 3'-hydroxyl group of ppp5'A2'p5'A2'p5'A (2-5A) is required for activation of the 2-5A dependent endonuclease // *J. Biol. Chem.*—1988.—263, N 3.—P. 1131—1139.
3. Sharma O. K., Goswami B. B., Cohrs R. J. Mechanism of growth inhibition of DNA containing viruses by interferon: role of 2-5A // *The 2-5A system: Mol. and clinical aspects of the interferon-regulated pathway*.—New York: Alan. R. Liss, 1985.—P. 317—324.
4. Bayard B., Bisbal C., Silhol M. et al. Increased stability and antiviral activity of 2'-O-phosphoglycerol derivatives // *Eur. J. Biochem.*—1984.—142, N 2.—P. 291—298.
5. Пастер Е. У., Овод В. В., Позур В. К., Вихоть Н. Е. Иммунология. Практикум.—К.: Вища шк., 1989.—302 с.
6. Козлов О. В., Ткачук З. Ю., Король А. С. Вивчення гідролізу продуктів розщеплення «кору» 2',5'-олигоаденилату // *Укр. біохім. журн.*—1993.—65, № 2.—С. 35—42.
7. Земсков В. М., Медуницин Н. В., Алексеев Л. П. и др. Стимуляция клеточного иммунитета низкомолекулярной РНК и ее мононуклеотидами // *Иммунология*.—1988.—№ 1.—С. 27—30.
8. Pat. T4378352. MKU A61K 19/20 USA (2'-5')Oligo-isoadenylate pharmaceutical compositions and method of use / A. Kimachi, M. Revel, S. Rappoport et al.—Publ. 29.03.83.

Ин-т молекуляр. биологии и генетики НАН Украины, Киев

Получено 07.02.94