

43. *Safrit J., Tsuchitani T., Zighubolm J., Bonavida B.* Ultra-low doses I. Ed. C. Doutrempuich Univ. Bordeaux, France, Tavior and France. London, Washington, D.C., 1991, p. 27–43.
44. *Коновалова Н.П., Франчи Ф., Дьячковская Р.Ф., Волкова Л.Н.* Изв. РАН. Сер. биол., 1998,
45. *Blumenfeld L.A., Grosberg A.Ju., Tikhonov A.N.* J. Chem. Phys., 1991, v. 95, № 10, p. 7541–7544.
46. *Лелекова Т.В., Романовский П.Я., Александров П.Н., Ашмарин И.П.* Бюл. эксперим. биол. и мед., 1989, т. 108, № 7, с. 8–10.
47. *Zaiuev S.V., Sazanov L.A.* J. Chem. and Biochem. Kin., 1991, v. 1, № 3, p. 21–26.
48. *Бурлакова Е.Б., Конрадов А.А., Худяков И.В.* Изв. РАН. Сер. биол., 1990, № 2, с. 184–193.
49. *Блюменфельд Л.А.* Биофизика, 1993, № 1, с. 129–132.
50. *Sergeeva M.G., Yonchar M.V., Chistyakov V.V., Merkh A.T.* Appl. Biochem. and Biotech., 1996, v. 61, p. 167–171.
51. *Пальмина Н.П., Мальцева Е.Л., Бурлакова Е.Б.* Хим. физика, 1995, т. 14, № 11, с. 47–60.
52. *Мальцева Е.Л., Пальмина Н.П., Бурлакова Е.Б.* Биол. мембраны, 1998, т. 15, № 2, с. 199–212.
53. *Lo S.Y.* Proceedings of the 1-st International Symposium. Ed. L.I. Brady, World Scientific Publishing Co., PTC Ltd., 1998, p. 3–47.

УДК 576.345 + 576.809.7

Действие некоторых цитотоксинов в сверхмалых концентрациях на клеточное звено иммунитета

Т. И. Новожилова, С. И. Малекин, В. К. Курочкин,
С. Бугхлала, М. В. Киселевский

ТАТЬЯНА ИВАНОВНА НОВОЖИЛОВА — кандидат химических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории биорегуляторов Государственного научно-исследовательского института органической химии и технологии (ГУП ГосНИИОХТ). Область научных интересов: токсины растительного, животного и микробного происхождения, механизмы их действия.

СЕРГЕЙ ИВАНОВИЧ МАЛЕКИН — доктор химических наук, профессор, заведующий лабораторией биорегуляторов ГУП ГосНИИОХТ. Область научных интересов: биоорганическая химия, соотношение структура-активность природных и синтетических биологически активных соединений.

111024 Москва, шоссе Энтузиастов, 23, ГУП ГосНИИОХТ, тел. (095) 273-87-03, факс (095) 273-27-70.

САМИРА БУГХЛАЛА — аспирант лаборатории клеточного иммунитета Онкологического научного центра им. Н. Н. Блохина (ОНЦ) РАМН. Область научных интересов: иммуномодулирующее действие природных биологически активных веществ.

МИХАИЛ ВАЛЕНТИНОВИЧ КИСЕЛЕВСКИЙ — доктор медицинских наук, заведующий лабораторией клеточного иммунитета ОНЦ РАМН. Область научных интересов: биотерапия рака, механизм цитотоксического действия эффекторов противоопухолевого иммунитета.

115478 Москва, Каширское шоссе, 24, ОНЦ РАМН, тел. (095) 324-27-94.

В работах последних лет по стратегии лечения рака выделяются две проблемы — регуляция иммунного статуса организма и химиотерапевтическое воздействие, приводящее к гибели опухолевых клеток. Развитие второго направления привело к созданию нового поколения препаратов, действие которых основано на принципе адресной доставки цитотоксических агентов к клетке-мишени. В настоящее время синтезировано значительное количество препаратов (иммунотоксинов), в которых в качестве эффекторной части молекулы выступают рибосоминактивирующие белки или их субъединицы (рицин, абрин, дифтерийный токсин, шигатоксин и др.) [1–5]. Следует отметить, что при создании иммунотоксинов наиболее часто используется рибин или его субъединица А, что связано в основном с большей доступностью этого токсина для исследований. Сообщается о доклинических испыта-

ниях иммунотоксинов с А-цепью рибина при лечении лейкемии и лимфомы [6], множественной миеломы [7] и др.

Вместе с тем существенной проблемой в клиническом использовании иммунотоксинов была и остается избирательность транспорта цитотоксического агента к клетке-мишени. Поиск новых переносчиков цитотоксинов, высокоспецифично взаимодействующих с клеткой-мишенью, среди моноклональных антител, молекулярных, генетических или метаболических маркеров опухолевых клеток, вирусоподобных структур [8] и т.д. приводит во многих случаях к созданию чрезвычайно дорогостоящих лекарств.

Наряду с химиотерапией получает развитие новое направление противоопухолевой терапии — биотерапия. Это метод лечения рака путем активизации естественных защитных механизмов, в которых централь-

ную роль играют иммунокомпетентные клетки — лимфоциты, естественные киллеры, макрофаги. Имеются также сведения о способности тромбоцитов периферической крови осуществлять противоопухолевое цитотоксическое действие [9]. Иммунный ответ, приводящий к элиминации опухолевых клеток из организма, обусловлен образованием цитотоксических клеток. При стимуляции иммунокомпетентных клеток секретируется множество биологически активных факторов, в том числе цитокинов, имеющих значение для процессов пролиферации, дифференциации и запуска эффекторных механизмов.

Основную роль в развитии клеточного иммунного ответа играет белок интерлейкин-2 (ИЛ-2). Он активирует цитотоксические Т-клетки и обеспечивает пролиферацию любых Т-клеток при условии экспрессии на их поверхности рецептора к ИЛ-2. В связи с этим применение ИЛ-2 для иммунотерапии раковых больных получило широкое распространение [10]. Большинство клинических испытаний, нацеленных на запуск специфического Т-клеточного ответа, основано на системном введении иммуномодулирующих цитокинов, таких как ИЛ-2. Однако системное введение цитокинов игнорирует паракринную природу их действия. Экспериментальные исследования дают основание считать, что главной причиной недостаточно высокой эффективности ИЛ-2-терапии является высокий уровень у онкологических больных Т-супрессоров, которые также подвержены активации под воздействием ИЛ-2, что приводит в конечном счете к выраженной иммунодепрессии.

Вышесказанное привело нас к заключению обратиться к поиску веществ, избирательно стимулирующих Т-клетки-киллеры, желательнее без вовлечения рецепторов к ИЛ-2. Определенный подход к решению данной задачи был выявлен на основании проведенного нами анализа литературы последних лет, посвященной взаимодействию в системе опухоль—иммунитет и ответным реакциям клеточных систем на воздействие малых и сверхмалых доз биологически активных веществ [11]. Так, например, при исследовании противоопухолевой активности антибиотика рубомицина в различных дозах — от терапевтической 2 мг/кг до $2 \cdot 10^{-6}$ мг/кг — относительно прививаемости и роста карциномы Льюис было установлено, что в терапевтической дозе рубомицин вызывает обычный цитотоксический эффект, в то время как в дозах $2 \cdot 10^{-2}$ — $2 \cdot 10^{-6}$ мг/кг препарат оказывал стимулирующее действие на прививаемые опухоли, т.е. снижался критический трансплантационный минимум. Результаты исследования рубомицина, а также ряда других веществ, активных по отношению к раковым клеткам (нитрозометилмочевина [12], адрибластин, цисплатина в концентрациях до 10^{-15} М), побудило нас начать изучение дозозависимого действия некоторых рибосоминактивирующих цитотоксинов, в частности ризицина, абрина, микотоксина Т-2, на процессы активации мононуклеарных клеток.

Цитотоксическое действие токсинов. Для определения концентраций цитотоксинов, вызывающих гибель клеток, в суспензию опухолевых клеток К562 вводили цитотоксины в разных концентрациях и измеряли количество оставшихся живых клеток по методу Мосмана с использованием водорастворимого бромида 3-(4,5-диметилтиазолил-2)-2,5-дифенилтетразолия. Зависимость степени гибели опухолевых клеток от концентрации цитотоксинов приведена на рис. 1.

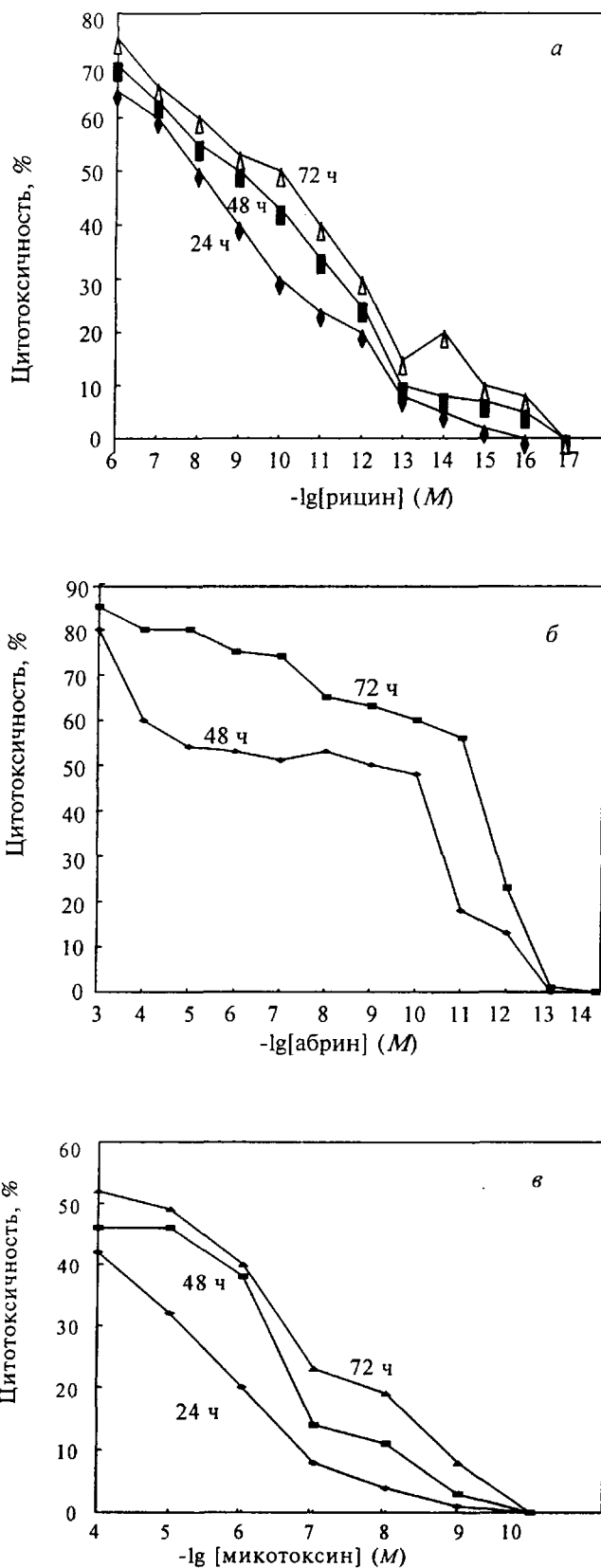


Рис. 1. Концентрационная зависимость птитотоксичности ризицина (а), абрина (б) и микотоксина Т-2 (в) по отношению к клеткам К562.

На кривых указано время инкубации $3 \cdot 10^4$ клеток

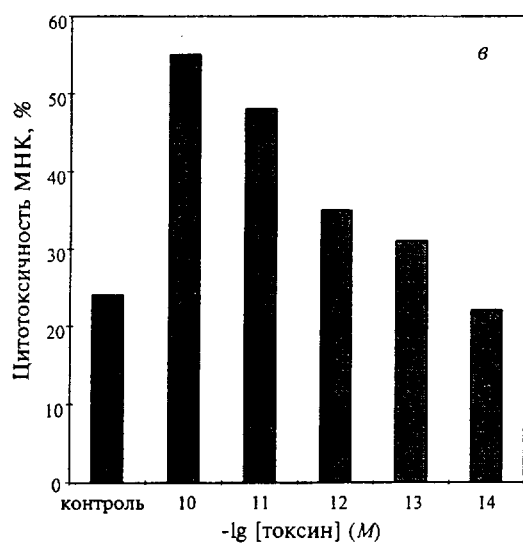
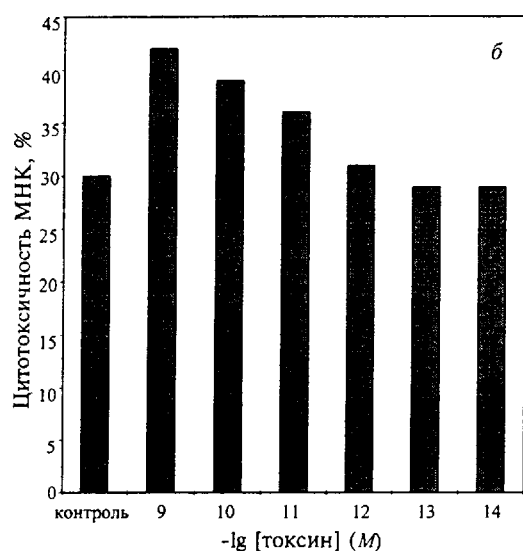
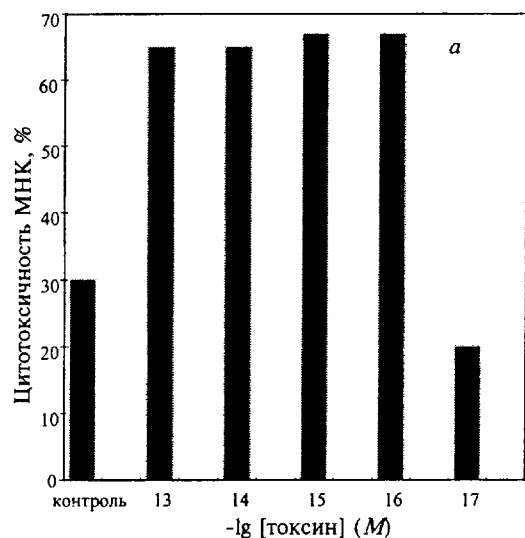


Рис.2. Концентрационная зависимость цитотоксичности мононуклеарных клеток (МНК), активированных рицином, 10^{-13} – 10^{-17} М (а), абрином, 10^{-9} – 10^{-14} М (б) и микотоксином, 10^{-10} – 10^{-14} М (в), по отношению к клеткам K562

Рицин является наиболее токсичным белком. Его эффективная доза (концентрация) $ED_{50}^{(24ч)} = 4,32 \cdot 10^{-8}$ ($6,6 \cdot 10^{-8} \div 2,9 \cdot 10^{-8}$) М, что согласуется с литературными данными [13]. Для абрина и микотоксина Т-2 $ED_{50}^{(48ч)} = 4,14 \cdot 10^{-7}$ М ($5,9 \cdot 10^{-8} \div 2,2 \cdot 10^{-6}$) М, $ED_{50}^{(72ч)} = 4,1 \cdot 10^{-4}$ М ($9,4 \cdot 10^{-5} \div 4,1 \cdot 10^{-3}$) М. Увеличение времени инкубации цитотоксинов с опухолевыми клетками приводит к росту их токсичности, что обусловлено механизмом действия данных белков.

Таким образом, можно полагать, что исследованные токсины практически не вызывают цитотоксического действия в концентрации: 10^{-13} М для рицина и абрина, 10^{-9} М для микотоксина Т-2.

Активация мононуклеаров цитотоксинами. Мононуклеарные клетки инкубировали с исследуемыми токсинами (рицин, абрин, микотоксин Т-2), которые добавляли в заведомо нецитотоксических дозах, затем активированные таким образом мононуклеары инкубировали с опухолевыми клетками K562 и по методу Мосмана измеряли количество живых клеток. В качестве контроля использовались неактивированные мононуклеарные клетки.

Результаты исследований (рис. 2) показали, что цитотоксичность мононуклеаров повышается в большей степени при инкубации их с рицином, ED_{50} которого равна $9,3 \cdot 10^{-16}$ ($8,98 \cdot 10^{-16} \div 1,01 \cdot 10^{-15}$) М. Для микотоксина Т-2 эффективная доза составляет $ED_{50} = 6,9 \cdot 10^{-9}$ ($4,58 \cdot 10^{-10} \div 7,9 \cdot 10^{-9}$) М. Менее выраженный эффект наблюдался при стимулировании мононуклеарных клеток абрином. Их цитотоксичность повышалась не более чем на 20% по сравнению с контролем при инкубации с абрином в концентрации 10^{-9} М.

Для выявления возможных механизмов стимулирующего действия цитотоксинов на мононуклеарные клетки, приводящих к увеличению цитотоксичности последних, инкубированные клетки центрифугировали, а супернатанты исследовали методом электрофореза (в 10%-ном полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия).

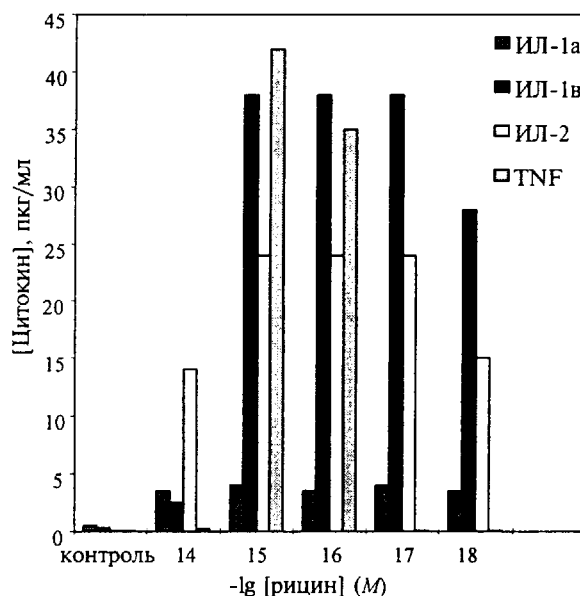


Рис.3. Влияние рицина в сверхмалых концентрациях на секрецию интерлейкина 1-альфа (ИЛ-1a), интерлейкина 1-бета (ИЛ-1b), интерлейкина-2 (ИЛ-2) и фактора некроза опухоли (TNF)

Таблица

Цитотоксичность мононуклеарных клеток (МНК), активированных рицином и другими факторами по отношению к опухолевым клеткам K562.

18-часовой тест, [МНК] : [мишень] = 25 : 1.

Контроль—нативные МНК, доля погибших клеток K562 30%

Активирующий фактор	Исследуемая концентрация, М	Цитотоксичность МНК, %
Рицин	10^{-13}	65
	10^{-14}	63
	10^{-15}	67
Ca ²⁺ -ионофор А-23187	10^{-8}	58
ФГА	10^{-8}	62
Кон А	10^{-8}	57

Достоверность по сравнению с контролем соответствует $P < 0,005$.

В качестве контроля использовали супернатанты после инкубации мононуклеаров с белками фитогемагглютинином (ФГА), конканавалином А (Кона) и Ca²⁺-ионофором (А-23187), традиционно применяемыми для активации лимфоцитов. И в этом случае более выраженный эффект был получен при инкубации с рицином (появление на электрофореграммах полос, соответствующих по молекулярной массе интерлейкину (12—30 кДа) и фактору некроза опухоли (TNF).

Для количественной оценки воздействия сверхмалых доз рицина на индукцию секреции цитокинов мононуклеарные клетки инкубировали с рицином в концентрациях 10^{-13} ÷ 10^{-19} М. Уровень цитокинов в супернатантах измеряли методом ELISA. В качестве контроля исследовались нативные (неинкубированные) мононуклеары. Результаты этого исследования представлены на рис.3.

Как видно на рис. 3, инкубация с рицином в концентрации 10^{-15} ÷ 10^{-16} М приводит к заметному увеличению секреции всех тестируемых цитокинов, что вызывает активизацию механизмов дифференцировки и пролиферации мононуклеарных клеток. В этих условиях эффект рицина подобен действию классических стимуляторов лимфоцитов (см. таблицу).

Из представленных в таблице данных следует, что цитотоксичность мононуклеаров, стимулированных рицином в концентрациях 10^{-13} ÷ 10^{-15} М, несколько выше цитотоксичности этих клеток, стимулированных ФГА, Кон А и Ca²⁺-ионофором при том, что они используются в концентрациях на 5—7 порядков выше, чем рицин.

Таким образом, на основании полученных результатов можно сделать вывод, что снижение доз исследованных цитотоксинов на 2 (абрин), 4 (микотоксин Т-2) и 8 (рицин) порядков приводит к появлению у этих цитотоксинов иммуномодулирующего действия на мононуклеарные клетки и повышению цитотоксичности за счет секретирования цитокинов.

Выявленные эффекты дают основание полагать, что дальнейшее развитие представленных исследований может оказаться перспективным в поиске лекарственных веществ, которые способны давать терапевтический эффект без существенного общего токсического действия.

ЛИТЕРАТУРА

1. Stirpe F., Barbieri L., Battelli M. e. a. Bio technology, 1992, v. 10, № 4, p. 405—412.
2. Theuer Ch.P., Pastan I. Amer. J. Surg., 1993, v. 166, № 3, p. 284—288.
3. Sweeney E.B., Murphy J.R. Assays Biochem., 1995, v. 30, p. 119—131.
4. Sandvig K., Van Deurs B. Physiol. Revs., 1996, v. 76, № 4, p. 949—966.
5. Kreitman R.J., Pastan I. Adv. Drug. Delivery Rev., 1998, v. 31, № 1—2, p. 53—88.
6. Engert A., Sausville E.A., Vitetta E. Curr. Top. Microbiol. and Immunol., 1998, v. 234, p. 13—33.
7. O'Tool J.E., Esseltine D., Lynch T.J. e. a. Ibid., 1998, v. 234, p. 35—56.
8. Pietersz G.A., Roland M.J., Smyth I.F. Adv. Immunol., 1994, v. 56, p. 301—386.
9. Abel M., Kay N.E., Jacob G. Blood, 1985, v. 65, p. 1252.
10. Dillman R.O. Cancer Biother., 1994, v. 9, № 3, p. 183—209.
11. Тез. 2-го Межд. симп. «Механизмы действия сверхмалых доз», Москва, 1995.
12. Фомина М.М., Островская Л.А., Корман Д.Б., Бурлакова Е.Б. Изв. АН, Сер. биол., 1995, № 4, с. 430—434.
13. Lin J.-Y., Chang Y.-Ch., Huang L.-K., Tung T.-Ch. Toxicon, 1973, v. 11, № 4, p. 379—381.