

О.В. Долга, Н.Х. Погорела, О.С. Богорад - Кобельська,
С.А. Андронаті, І.С. Магура

Вплив аміксину на електрофоретичну рухомість Т-лімфоцитів миші

Методом клітинного електрофорезу досліджували ранні зміни електрофоретичної рухомості (ЕФР) Т-лімфоцитів селезінки миші, індуковані аміксином у досліді in vitro. Показано, що в перші години впливу аміксин достовірно збільшував абсолютне значення ЕФР Т-лімфоцитів у порівнянні з контролем. Ефект аміксину залежав від його концентрації в інкубаційному середовищі та тривалості впливу. Отримані результати дають змогу зробити висновок про те, що під впливом аміксину збільшувався сумарний негативний поверхневий заряд плазматичної мембрани Т-лімфоцитів. Цей ефект може мати важливе значення для міжклітинної кооперації в процесі реалізації імунної відповіді.

Ключові слова: аміксин, індуктори інтерферону, електрофоретична рухомість, Т-лімфоцити.

ВСТУП

Індуктори інтерферонів (ІФН) – інтерфероногени – відносяться до нового перспективного покоління лікарських препаратів, що викликають в організмі продукцію власного (ендогенного) ІФН. Використання інтерфероногенів у клінічній практиці є не лише повноцінною заміною екзогенних ІФН, але також має певні переваги щодо них. Зокрема, інтерфероногени позбавлені антигенності та можуть використовуватися впродовж тривалого часу. Вони не викликають гіперінтерференомії, оскільки синтез індукваного ІФН є збалансованим і контролюється організмом. Одноразове введення індуктора ІФН забезпечує довготривалу (впродовж кількох діб) циркуляцію в організмі ІФН у терапевтичній концентрації [7–9, 18].

Інтерфероногени – речовини природного або синтетичного походження. Серед низькомолекулярних синтетичних індукторів ІФН одним з найбільш ефективних є аміксин (вітчизняний аналог тилорону) – похідне флуоренону. Ця сполука має протівірусну,

інтерфероніндукувальну, імуномодулювальну та протипухлинну активність. Завдяки вказаним властивостям аміксин успішно використовується у онкології, клінічній імунології, при інфекційних захворюваннях різної етіології [1, 10, 11].

Аміксин індукує in vivo продукцію α -, β - та γ -ІФН в еритроцитах, гепатоцитах, гранулоцитах та Т-лімфоцитах, проникає через гематоенцефалічний бар'єр і спричиняє синтез ІФН у клітинах мозку [7].

Початковий етап інтерфероногенезу – взаємодія аміксину з плазматичною мембраною – та його роль у подальшій передачі сигналу для експресії генів ІФН залишаються недостатньо вивченими. Аміксин відноситься до амфіфільних сполук. Його молекула містить неполярний гідрофобний домен, до складу якого входять ароматичні кільця, та два симетричні гідрофільні бокові ланцюги, заряджені позитивно при фізіологічних значеннях рН. Така хімічна структура дає змогу аміксину ефективно впливати на мембрану. Важливе значення у цих процесах має поверхневий заряд клітини. Відповідно до сучасних уявлень,

© О.В. Долга, Н.Х. Погорела, О.С. Богорад - Кобельська, С.А. Андронаті, І.С. Магура

останній бере участь у регуляції великої кількості процесів, серед яких, зокрема, адгезія клітин, їх взаємодія між собою та з позаклітинним матриксом, поділ і диференціювання клітин, продукція монокінів. Зміна величини поверхневого заряду призводить до порушення функцій клітин та розвитку патологій [14-16]. Таким чином, дослідження ендogenous і фармакологічних механізмів регуляції густини поверхневого заряду є актуальним завданням.

Для вивчення поверхневого заряду клітини широко використовується мікроелектрофорез [15]. Цей метод дає можливість визначити величину заряду, не змінюючи при цьому властивостей поверхні клітини. Нині він успішно застосовується в медицині, зокрема для моніторингу змін імунологічного гомеостазу при імуномодулювальній терапії [3, 17].

У літературі відсутні дані стосовно дії аміксіну на поверхневий заряд клітин. Особливої уваги заслуговує вивчення впливу аміксіну на поверхневий заряд Т-лімфоцитів. Це пов'язано з тим, що зміна величини поверхневого заряду може впливати на взаємодію Т-лімфоцитів з іншими імунокомпетентними клітинами в процесі презентації антигена, і, тому, мати велике значення для регуляції імунної відповіді.

Мета нашої роботи полягала у вивченні впливу аміксіну на електрофоретичну рухомість (ЕФР) Т-лімфоцитів у перші години його впливу.

МЕТОДИКА

Реактиви. В роботі використовували 2,7-біс-[2-(діетиламіно)етокси]флуорен-9-он дігидрохлорид (аміксин) [2]. Для приготування базового розчину вказану сполуку розчиняли у дистильованій воді до кінцевої концентрації 2 мг/мл. У роботі використовували солі кваліфікації «хч» і «осч» («Реахим», Росія).

Виділення лімфоцитів. Лімфоцити отри-

мували із селезінки мишей лінії СВА 8-тижневого віку (самці) [12] і розділяли на колонках з нейлоновою ватою [13]. Кількість Т-лімфоцитів у збагаченій таким чином суспензії клітин була не менше ніж 80 % [6].

Обробка клітин аміксином. Т-лімфоцити ($6,5 \cdot 10^5$ клітин/мл) інкубували за наявності 6, 25 або 50 мкг/мл аміксіну у збалансованому сольовому розчині, що містив (ммоль/л): NaCl - 140,0, KCl - 2,5, CaCl₂ - 2,0, MgCl₂ - 1,0, тріс-HCl - 10,0 (рН 7,4), глюкоза - 5,0, впродовж вказаного часу при 37 °С. Для кожної концентрації аміксіну готували 3 незалежні зразки. Кількість клітин з пошкодженою мембраною до і після інкубації з аміксином визначали за їхнім забарвленням трипановим синім [12]. Після обробки аміксином (50 мкг/мл) протягом 2 год їх число не перевищувало 7 % відносно контролю.

Вимірювання електрофоретичної рухомості клітин. Після інкубації з аміксином лімфоцити двічі промивали розчином, який містив (ммоль/л) KCl - 2,5, CaCl₂ - 2,0, тріс-HCl - 10,0 (рН 7,4), глюкоза - 280,0, за допомогою центрифугування впродовж 10 хв при 400 g. ЕФР клітин визначали у тому самому розчині при 20 °С за методикою, описаною раніше [5]. У кожному зразку вимірювали ЕФР не менше ніж 30 клітин.

Аналіз експериментальних результатів. Статистичний аналіз експериментальних результатів проводили, використовуючи комп'ютерну програму Microsoft Excel та OriginPro 7.0. Рівень достовірності при оцінці істинного значення вимірюваної величини ЕФР становив 95 %. Результати представлені як середні ± помилка середнього. Для визначення достовірності при порівнянні середніх значень використовували критерій t Стьюдента. Значення вважали достовірними при $P < 0,001$. При побудові гістограм розподілу ЕФР контрольних та оброблених аміксином Т-лімфоцитів підсумовували вибірки трьох незалежних зразків.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

У перші години після впливу аміксіну збільшувалось абсолютне значення ЕФР Т-лімфоцитів селезінки миші. Частотні гістограми ЕФР до та після обробки лімфоцитів аміксіном (50 мкг/мл) впродовж 2 год при 37 °С представлені на рис. 1. Результати вимірювання ЕФР свідчать про те, що взаємодія аміксіну з мембраною лімфоцитів достовірно збільшувала середнє значення ЕФР клітин на 11,9 % ($1,13 \pm 0,09$ щодо $1,01 \text{ мкм} \cdot \text{см} \cdot \text{В}^{-1} \cdot \text{с}^{-1} \pm 0,05 \text{ мкм} \cdot \text{см} \cdot \text{В}^{-1} \cdot \text{с}^{-1}$ у контролі, $P < 0,001$). Розкид індивідуальних значень ЕФР у популяції контрольних та інкубованих з аміксіном клітин відрізнявся неістотно (стандартне відхилення становило 0,40 та 0,35 відповідно). Слід відмітити, що у різних серіях дослідів середні значення ЕФР контрольних лімфоцитів незначно варіювали, але виявлений характер змін електроповерхневих властивостей клітин після інкубації з аміксіном зберігався.

Ефект аміксіну залежав від його концентрації у інкубаційному середовищі. В інтервалі оптимальних інтерфероніндукованих концентрацій (6–50 мкг/мл) ми спостерігали дозозалежне зростання ЕФР (рис. 2). Т-лімфоцити інкубували з аміксіном 2 год при 37 °С у збалансованому сольовому розчині.

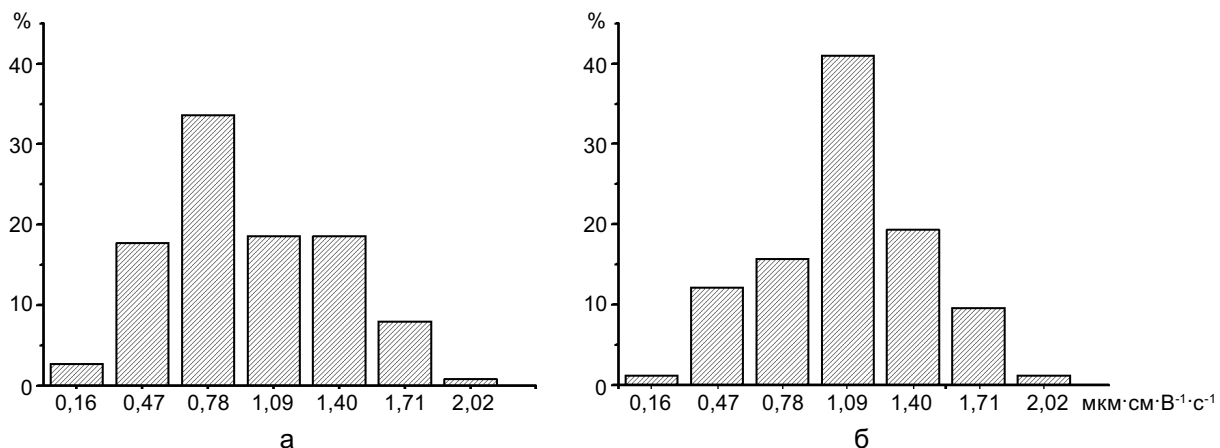


Рис. 1. Частотні гістограми електрофоретичної рухомості (ЕФР) Т-лімфоцитів селезінки миші: а – контроль; б – після обробки аміксіном. Т-лімфоцити інкубували за наявності 50 мкг/мл аміксіну впродовж 2 год при 37 °С

Зміна значення ЕФР Т-лімфоцитів у процесі їх інкубації з аміксіном (50 мкг/мл) представлена на рис. 3. Слід відмітити, що ЕФР достовірно ($P < 0,001$) збільшувалася протягом першої години, а потім практично не змінювалася впродовж наступної години.

ЕФР клітин залежить від густини поверхневого заряду їх плазматичної мембрани. Тому, на основі отриманих результатів можна зробити висновок про те, що взаємодія аміксіну з поверхнею Т-лімфоцитів призводить до збільшення їх сумарного негативного поверхневого заряду, та припустити, що під його впливом змінюються фізико-хімічні властивості плазматичної мембрани Т-лімфоцитів.

Т-лімфоцити являють собою основу клітинної ланки специфічної імунної відповіді. Зміна заряду їх поверхні може мати важливе значення при міжклітинній взаємодії в процесі реалізації імунної відповіді. Крім того, величина поверхневого заряду визначає ліпід-ліпідні, білок-ліпідні, білок-білкові взаємодії в мембранах, впливає на примембранну концентрацію іонів, дифузю, пасивний та активний транспорт, активність мембранозв'язаних ферментів і потенціалкероаних іонних каналів [4, 15, 16]. Таким чином, аміксин за допомогою модуляції поверхневого заряду може регулювати різноманітні ланки активаційної програми

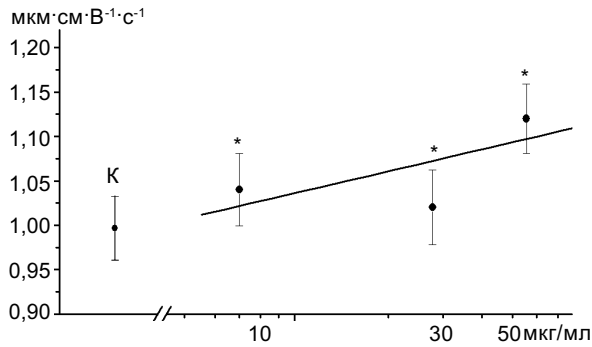


Рис. 2. Залежність електрофоретичної рухомості (ЕФР) Т-лімфоцитів селезінки миші від концентрації аміксину. Т-лімфоцити інкубували за наявності аміксину впродовж 2 год при 37°C. К – середнє значення ЕФР контрольних клітин. * P < 0,001 порівняно з контролем

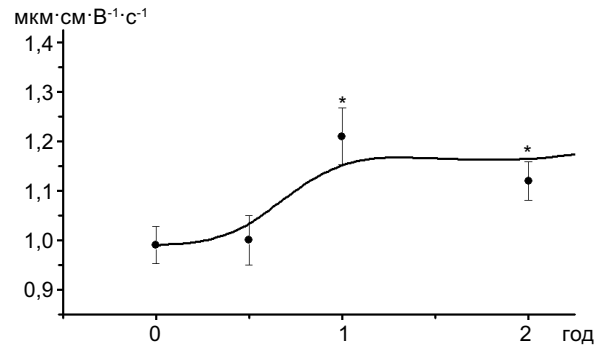


Рис. 3. Залежність електрофоретичної рухомості (ЕФР) Т-лімфоцитів від тривалості дії аміксину. Т-лімфоцити інкубували за наявності 50 мкг/мл аміксину при 37°C. * P < 0,001 порівняно з контролем

Т-лімфоцитів. Отримані експериментальні результати важливі для розуміння механізмів імуномодулювального ефекту аміксину.

Автори висловлюють щире подяку к.х.н. С.А. Ляхову за люб'язно наданий 2,7-біс-[2-(діетиламіно)етокси]флуорен-9-он дегідрохлорид (аміксин), синтезований у Фізико-хімічному інституті ім. О.В. Богатського НАН України.

**Е.В. Долгая, Н.Х. Погорелая,
Е.С. Богорад-Кобельская, С.А. Андронати,
И.С. Магура**

ВЛИЯНИЕ АМИКСИНА НА ЭЛЕКТРОФОРЕТИЧЕСКУЮ ПОДВИЖНОСТЬ Т-ЛИМФОЦИТОВ МЫШИ

Методом клеточного электрофореза исследовали ранние изменения электрофоретической подвижности (ЭФП) Т-лимфоцитов селезенки мыши, индуцированные амиксином в опытах *in vitro*. Показано, что в первые часы воздействия амиксин достоверно увеличивал абсолютное значение ЭФП Т-лимфоцитов по сравнению с контролем. Эффект амиксина зависел от его концентрации в инкубационной среде и длительности воздействия. Полученные результаты позволяют сделать вывод о том, что под воздействием амиксина увеличивался суммарный отрицательный поверхностный заряд плазматической мембраны Т-лимфоцитов. Этот эффект может иметь важное значение для межклеточной кооперации в процессе реализации иммунного ответа. Ключевые слова: амиксин, индукторы интерферона, электрофоретическая подвижность, Т-лимфоциты.

**E.V. Dolgaya, N.Kh. Pogorelaya,
E.S. Bogorad-Kobelskaya, S.A. Andronati,
I.S. Magura**

EFFECTS OF AMIXINE ON ELECTROPHORETIC MOBILITY OF MURINE T LYMPHOCYTES

The amixine-induced early changes in the electrophoretic mobility (EPM) of murine splenic T lymphocytes were studied *in vitro* by the microelectrophoresis technique. It has been found that T lymphocytes treated with amixine have a greater EPM within the first hours of amixine addition than control cells. This change in EPM depends on the concentration of amixine in the medium and the duration of amixine exposure. It was concluded that the amixine-treated cells have a greater net negative surface charge density than control cells. This effect may play an important role in the cell-cell interaction during the immune response.

Key words: amixine, interferon inducers, electrophoretic mobility, T lymphocytes.

*O.O. Bogomoletz Institute of Physiology National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv;
D.K. Zabolotny Institute of microbiology and virology National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv
O.V. Bogatsky Physico-Chemical Institute National Academy of Sciences of Ukraine, Odesa*

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Андронати С.А., Литвинова Л.А., Головенко Н.Я. Пероральний індуктор ендогенного інтерферона «Аміксин» і його аналоги // Журн. АМН України. – 1999. – 5, № 1. – С. 53–66.
2. Богатський О.В., Грень А.І., Литвинова Л.О., Лемпарт Г.В. Про синтез 2,7-біс-[2-(діетиламіно)етокси]-флуорен-9-ону // Доп. АН УРСР. Сер. Б. – 1976. – № 7.

- С. 610–612 .
3. Вихрев Д.В., Журавель В.А., Стукова Н.Ю., Семенов М.С., Фирстова В.В., Мелешенко Н.Ю., Цека Ю.С., Ледванов М.Ю. Эффективность мониторинга изменений иммунологического гомеостаза при инфекционных заболеваниях методом свободного распределительного клеточного электрофореза // Мед. иммунология. – 2001. – **3**, № 2. – С.216.
 4. Гринштейн С.В., Кост О.А. Структурно-функциональные особенности мембранных белков // Усп. биол. химии. – 2001. – **41**. – С. 77–104.
 5. Долгая Е.В., Миронов С.Л., Погорелая Н.Х. Исследования поверхностного заряда нейронов спинальных ганглиев крыс при помощи метода микроэлектрофореза // Нейрофизиология. – 1984. – **16**, № 2. – С. 176–182.
 6. Долгая Е.В., Крылова И.В., Рожманова О.М. Изменение электрофоретической подвижности Т-лимфоцитов мыши под влиянием конканавалина А // Биол. мембраны. – 1991. – **8**, № 7. – С. 755–762.
 7. Ершов Ф.И. Система интерферона в норме и при патологии. – М.: Медицина, 1996. – 240 с.
 8. Интерферонотерапия: перспективы клинического применения. Руководство для врачей / Ред. Романцов М.Г. – М.; СПб.: НТФФ «Полисан», 1998. – 41 с.
 9. Співак М.Я., Карпов О.В., Жолобак Н.М., Лазаренко Л.М., Тимошок Н.О., Зоценко В.М., Грабченко Н.І., Ганова Л.О., Михайленко О.М. Индукторы интерферону – від теорії до практики // Мікробіол. журн. – 2003. – **65**, № 1-2. – С. 191–204.
 10. Филиппова Т.О., Головенко Н.Я. Тилорон: профиль биологической активности. I. Фармакологические свойства // Интегр. Антропология. – 2006. – № 1 (7). – С. 18–23.
 11. Филиппова Т.О., Головенко Н.Я. Тилорон: профиль биологической активности. II. Фармакокинетика, токсичность, механизмы действия // Там само. – 2006. – № 2 (8). – С. 36–41.
 12. Хант С. Выделение лимфоцитов и вспомогательных клеток. – В кн.: Лимфоциты. Методы / Ред. Дж. Клаус, пер. с англ. – М.: Мир, 1990. – С. 15–68.
 13. Эклирт Р. Разделение клеток иммунной системы. – В кн.: Иммунологические методы / Ред. Фримель Г., пер. с нем. – М.: Мир, 1987. – С.226–253.
 14. Bauer J., Stünkel K.G.E., Kachel V. Linkage between monokine production and regulation of the negative surface charge density of human monocytes // Immunol. Invest. – 1992. – **21**, № 6. – P. 507–521.
 15. Korohoda W., Wilk A. Cell electrophoresis – a method for cell separation and research into cell surface properties // Cell. Mol. Biol. Lett. – 2008. – **13**, № 2. – P. 312–326.
 16. Mehrishi J. N., Bauer J. Electrophoresis of cells and the biological relevance of surface charge // Electrophoresis. – 2002. – **23**, № 13. – P. 1984–1994.
 17. Schutt W., Thomaneck U., Knippel E., Rychly J., Klinkmann H. Biomedical and clinical applications of automated single cell electrophoresis // Electrophoresis. – 1990. – **11**, № 11. – P. 970–975.
 18. Silin D.S., Lyubomska O.V., Ershov F.I., Frolov M.V., Kutsyna G.A. Synthetic and natural immunomodulators acting as interferon inducers // Current Pharmaceutical Design. – 2009. – **15**, № 11. – P. 1238–1247.

Ин-т фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України, Київ;
Ин-т мікробіології та вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України, Київ;
Фізико-хім. ін-т ім. О.В. Богатського НАН України, Одеса
E-mail: dolgaya@biph.kiev.ua

*Матеріал надійшов до
редакції 05.07.2010*