

ОЦЕНКА ВЛИЯНИЯ АРАБИНОФУРАНОЗИЛЦИТОЗИН-5`-МОНОФОСФАТА И ЕГО КОМПЛЕКСА С ЭМОКСИПИНОМ НА ФУНКЦИОНАЛЬНОЕ СОСТОЯНИЕ СУБПОПУЛЯЦИЙ ЛИМФОЦИТОВ

Сыса А.Г., Жуковец Т.А., Ханчевский М.А.

Белорусский государственный университет,

МГЭИ им. А.Д. Сахарова БГУ

Актуальность. Аналоги азотистых оснований и нуклеозидов реализуют свои цитотоксические эффекты, имитируя собой естественные эндогенные нуклеозиды (после фосфорилирования - нуклеотиды) [1,2]. Механизм действия может быть связан либо с ингибированием ферментов, либо с подменой эндогенных нуклеозидов в качестве субстратов в ходе синтеза молекул нукleinовых кислот, что приводит к повреждению ДНК и РНК и нарушению процессов метилирования ДНК [3].

Часто процесс трифосфорилирования нуклеозидных аналогов затруднен или невозможен из-за высокой специфичности клеточных нуклеозид- и нуклеотидкиназ. Использовать непосредственно нуклеозид-5'-монофосфаты не удается из-за того, что их транспорт в клетку крайне ограничен; кроме того, на мембране клетки они быстро разрушаются до соответствующих нуклеозидов.

Эти причины вызывают широкий интерес к синтезу химически модифицированных нуклеозидмонофосфатов и их аналогов, которые бы обладали способностью проникать в клетку и в результате химических или ферментативных трансформаций превращаться в соответствующие антиметаболиты.

Другим аспектом, ограничивающим использование цитостатических препаратов, является то, что эти препараты обладают нежелательными побочными эффектами. В связи с этим привлекательным является поиск веществ или их комбинаций (с антиоксидантами, в частности), применение которых будет приводить к снижению показателей интоксикации в организме опухоленосителей.

Целью настоящей работы являлась оценка влияния модифицированного нуклеотида арабинофуранозилцитозин-5`-монофосфата в виде свободной кислоты (ара-ЦМФ 5), а также его соли (ара-ЦМФ+Em 7) с 6-метил-2-этилпиридинолом-3 (Эмоксипином 6) (синтетическим производным 3-гидроксиридиана с сильным антиоксидантным действием) на жизнеспособность мононуклеаров периферической крови, количество и пролиферацию лимфоцитов в условиях митоген-индуцированной стимуляции клеток.

Методы исследования. *Получение ара-ЦМФ 5 и ара-ЦМФ+Em 7.* Синтез 5`-монофосфата арабинофуранозилцитозина 5 (ара-ЦМФ) осуществляли согласно схеме, представленной на рис. 1.

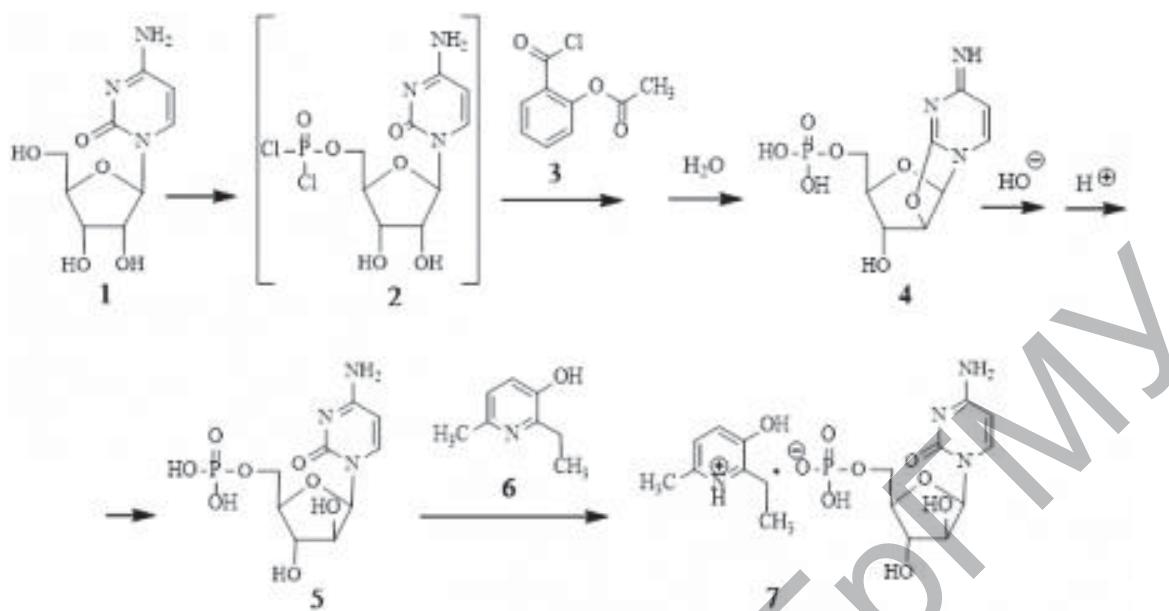


Рис. 1. Схема синтеза ара-ЦМФ 5 и ара-ЦМФ+Ем 7

Синтез эмоксипина **6** осуществляли согласно методике, представленной в работе [4]. Эмоксипиновую соль ара-ЦМФ+Ем **7** получали упариванием досуха раствора эквимолярных количеств ара-ЦМФ **5** и эмоксипина **6** в воде. Образовавшийся порошок ара-ЦМФ+Ем **7** высушивали в вакууме при 60°C до постоянного веса.

Выделение мононуклеаров периферической крови. Мононуклеары (МНК) выделяли из периферической крови здоровых доноров стабилизированной гепаринатом натрия (25 Ед/мл) путем центрифугирования на одноступенчатом градиенте плотности фиколл-верографина $\rho = 1,077$ г/см³, «Sigma» (Германия) при 1500 об/мин., 6°C в течение 30 мин. Образовавшееся интерфазное кольцо дважды отмывали центрифугированием (10 мин., 1500 об/мин) в физиологическом растворе (РУП «Белмедпрепараты», РБ), содержащим 5% инактивированную эмбриональную телячью сыворотку «ЭТС Gibco» (Германия). Для подсчета концентрации мононуклеаров использовали методику определения количественных показателей периферической крови с помощью автоматического анализатора (Sysmex XP-300, Япония).

Культивирование мононуклеаров периферической крови. Мононуклеары периферической крови, предварительно окрашенные CFSE (5(6)-карбоксифлуоресцеин диацетат N-сукцинимидиловым эфиром (CFSE), «Sigma» (Германия)), в концентрации 2×10^6 клеток/мл культивировали в полной культуральной среде в отсутствии/присутствии поликлонального стимулятора – 2,5 мг/л фитогемагглютинин «Sigma» (Германия). Полная культуральная среда включала питательную среду RPMI-1640 «Lonza» (Бельгия), 10% эмбриональной телячьей сыворотки «HuClone» (Великобритания), 2мМ глутамина «Lonza» (Бельгия) и комплекс антибиотиков, содержащий 100 Ед/мл бензилпенициillin

натрия, 100 Ед/мл стрептомицин сульфата и 100 Ед/мл неомицин сульфата «Gibco» (США).

Для оценки иммуномодулирующего действия модифицированных нуклеотидов в пробы с нестимулированными или митоген-активированными МНК добавляли исследуемые вещества в разных концентрациях. Культивирование осуществлялось в течение 6 дней во влажной камере при 37°C и 5% CO₂.

Метод проточной цитометрии. Количественный анализ пролиферативной активности лимфоцитов проводился с помощью проточной цитометрии. Результаты регистрировали на проточном цитометре CytoFLEX «Beckman Coulter» (США) на 20000 событий в случае. Визуализация полученных данных осуществлялась в виде гистограмм и диаграмм распределения клеточных субпопуляций в зависимости от светорассеяния и интенсивности флуоресценции CFSE.

Результаты и их обсуждение. В работе был проведен анализ функционального состояния субпопуляций лимфоцитов периферической крови в условиях воздействия исследованных соединений. Особый интерес представляет динамика тех клеточных фракций, которые связаны с ответной реакцией на окислительный стресс, который неизбежно возникает при действии цитостатических препаратов и сопровождается повышенным накоплением токсичных продуктов перекисного окисления липидов и дисбалансом звеньев системы антиоксидантной защиты [5].

В норме все механизмы регуляции настроены таким образом, что увеличение содержания активных форм кислорода приводит к увеличению активности антиоксидантных систем, что возвращает уровень свободных радикалов в норму. При развитии патологического состояния эти механизмы регуляции нарушаются. Продукты окислительного стресса изменяют иммунные реакции, вызывая повышение содержания провоспалительных цитокинов, в том числе IFN γ [6].

В настоящей работе мы исходили из предположения, что наряду с увеличением содержания провоспалительных цитокинов повышается пролиферация соответствующих цитокин-синтезирующих клеток, о чем свидетельствовало изменение удельного веса фракций IFN γ ⁺-лимфоцитов. Действительно, добавление ара-ЦМФ **5** и его соли АРА-ЦМФ+Em **7** в концентрациях 10⁻⁶ – 10⁻⁴ М к культурам мононуклеаров влияло на соотношение субпопуляций CD3⁻IFN γ ⁺ (NK-клетки) и CD3⁺IFN γ ⁺ (T-лимфоциты) (рис. 2 и 3).

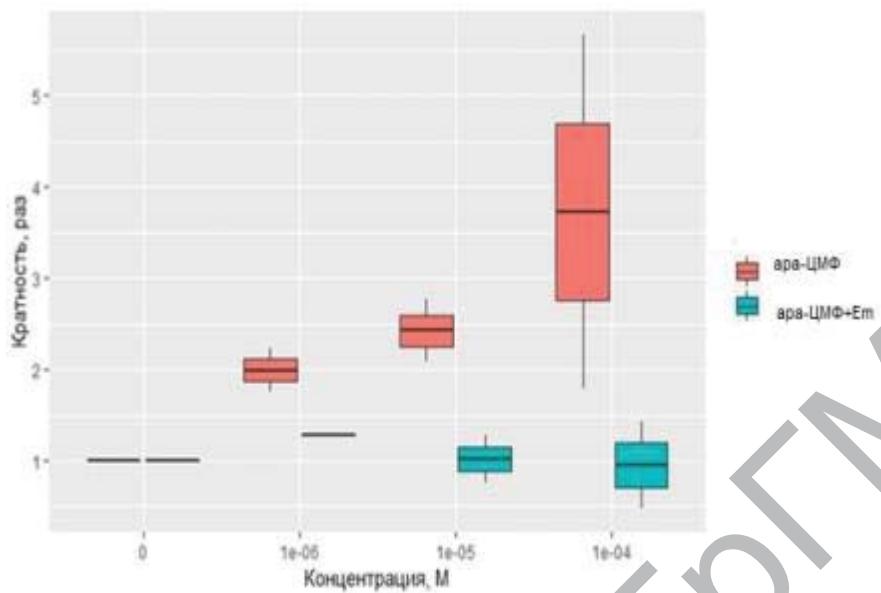


Рис. 2. Зависимость влияния ара-ЦМФ 5 и ара-ЦМФ+Em 7 на удельный вес субпопуляции $CD3^+IFN\gamma^+$ -клеток (число увеличения удельного веса по сравнению с контролем)

Как видно из данных, представленных на рис. 2, в исследованном диапазоне концентраций ара-ЦМФ 5 приводил к 2–4-кратному увеличению содержания субпопуляции $CD3^+IFN\gamma^+$ -клеток по сравнению с контролем. В то время как культивирование в среде, содержащей ара-ЦМФ+Em 7, такого эффекта не наблюдалось.

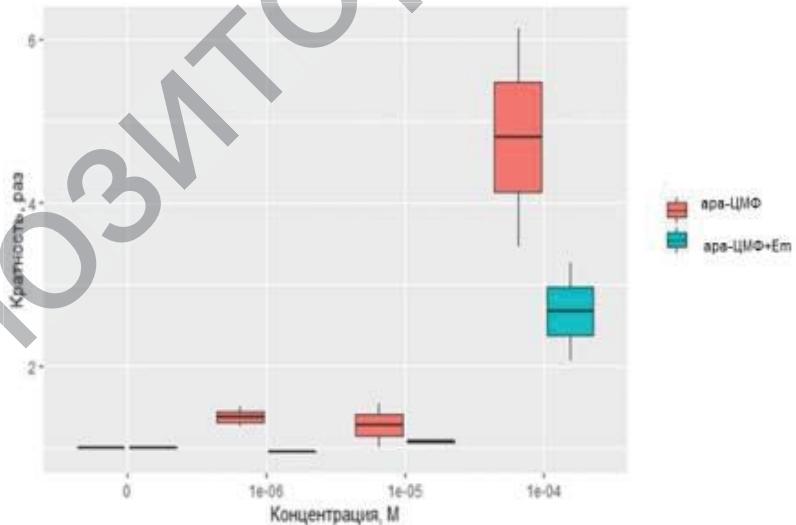


Рис. 3. Зависимость влияния ара-ЦМФ 5 и ара-ЦМФ+Em 7 на удельный вес субпопуляции $CD3^+IFN\gamma^+$ -клеток (число увеличения удельного веса по сравнению с контролем)

Как видно из данных, представленных на рис. 3, в исследованном диапазоне концентраций ара-ЦМФ 5 не приводил к изменению удельного веса

субпопуляции $CD3^+IFN\gamma^+$ Т-лимфоцитов по сравнению с контролем. Лишь в максимальных исследованных концентрациях наблюдалось пятикратное увеличение удельного веса субпопуляции $CD3^+IFN\gamma^+$ Т-лимфоцитов в случае ара-ЦМФ 5 и трехкратное увеличение в случае соли ара-ЦМФ+Ем 7.

Выводы. Таким образом, в условиях неспецифической стимуляции лимфоциты отвечали на введение в культуральную смесь антиметаболита ара-ЦМФ 5 не только остановкой деления клеток и клеточной гибелью, но и увеличением фракций клеток, секретирующих провоспалительные цитокины, как системной реакции на возросший в результате разрушения клеток уровень АФК. Отметим, что присутствие в смеси эмоксипина (вещества, обладающего антиоксидантными свойствами) практически полностью нивелировало обнаруженный эффект.

Работа выполнена при поддержке Белорусского республиканского фонда фундаментальных исследований (грант Х18МВ-019).

ЛИТЕРАТУРА

1. The purine analog fludarabine acts as a cytosolic 5'-nucleotidase II inhibitor / F. Cividini [et al.] // Biochem. Pharmacol. - 2015. - Vol. 94. - P. 63-68.
2. The dominant role of proofreading exonuclease activity of replicative polymerase ε in cellular tolerance to cytarabine (Ara-C) / M. Tsuda // Oncotarget. - 2017. - Vol. 8. - P. 33457-33474.
3. Huang, P. Termination of DNA synthesis by 9-β-d-arabinofuranosyl-2-Fluoroadenine: a mechanism for cytotoxicity / P. Huang, S. Chubb, W. J. Plunkett // Biol. Chem. - 1990. - Vol. 265. - P. 16617-16625.
4. Kuo, Y. Synthesis of chiral 3-substituted gamma-lactones and 9-furanosyladenine from (R)-2-(2,2-diethoxyethyl)-1,3-propanediol monoacetate prepared by lipase-catalyzed reaction / Y. Kuo, K. Shih // Chem. Pharm. Bull. - 1991. - Vol. 39, № 1. - P. 181-183.
5. Сорока, Ю. В. Метаболические нарушения при хронической неопластической интоксикации и применении цитостатической терапии / Ю. В. Сорока // Journal of Siberian Medical Sciences. - 2013. - № 2. - P. 1-7.
6. Agita, A. Inflammation, immunity, and hypertension / A. Agita, M. T. Alsagaff // Acta Med. Indones. - 2017. - Vol. 49, № 2. - P. 158-165.

АНАЛИЗ ИСХОДОВ КАРОТИДНОЙ ЭНДАРТЕРЭКТОМИИ В ГРОДНО

Тименова С.В., Антипина Е.О.

Гродненский государственный медицинский университет

Актуальность. Острые нарушения мозгового кровообращения продолжают оставаться одной из ведущих причин смертности и стойкой нетрудоспособности