УДК 612-083/612.017→612.014.16

ВПЛИВ СПОЛУК З РЯДУ ІМІДАЗО[2,1-b]ТІАЗОЛІВ НА ПОКАЗНИКИ ІМУНОЛОГІЧНОЇ РЕЗИСТЕНТНОСТІ В УМОВАХ IN VITRO

Козар В. В., Кудря М. Я., Павленко Т. О., Сова О.М., Яременко Ф.Г

Державна установа «Інститут проблем ендокринної патології ім. В. Я. Данилевського, АМН України»

Сучасні дослідження в області фундаментальної і клінічної імунології довели роль недостатності тієї чи іншої ланки імунної системи у розвитку багатьох захворювань та їх ускладнень, у тому числі ендокринних [1]. Тому важливим є пошук лікарських засобів, які мають сприятливий вплив на функціональний стан імунної системи.

На сьогодні існує цілий ряд лікарських засобів (ЛЗ) синтетичного та біологічного походження, які проявляють імунотропну активність. До таких імуномодуляторів належить левамізол - гідрохлорид (-)6-феніл-2,3,5,6-тетрагідроімідазо[2,1-b]тіазолу - імунокоректор, який вибірково стимулює регуляторну функцію Т-лімфоцитів і фагоцитів (моноцитів-макрофагів, нейтрофілів), сприяючи хемотаксису та фагоцитозу останніх. Проте, наявність вираженої побічної дії левамізолу, зокрема, на кровотворну систему обмежує використання цього досить активного препарату в медичній практиці [2].

В лабораторії синтезу гормоноподібних сполук ДУ «ІПЕП ім. В.Я.Данилевського АМНУ» (м. Харків) синтезовано сполуку - похідне левамізолу. Дана сполука менш токсична порівняно з левамізолом: левамізол за даними гострої токсичності відносять до 4 класу (мало токсичні сполуки), похідне левамізолу за попередніми даними можна віднести до 5 класу (практично нетоксичні сполуки).

Метою роботи було дослідження дії імуномодулятора левамізолу та його похідного на клітинну, фагоцитарну ланки імунітету, міграційну здатність лейкоцитів в умовах in vitro.

Матеріали та методи

Субстанція левамізолу виділялась із лікарської форми таблеток Декаріс (Угорщина) і додатково кристалізувалась зі спирту, за т. пл. (227 – 228 ºС) відповідала літературним даним [3]. Протонний магнітний резонанс (ПМР) спектр у диметилсульфоксид-d_6(300МГц): 12,0 с. 1Н (HCl); 7,39 – 7,46 м. 5Н (Ph); 5,78 дд. /8,5 10,4/ (6СН); 4,25 т 1Н / 10,2/ і 3,64 дд. 1Н /8,4 10,0/ (5-CH_2); 3,76 м. 2Н (2-CH_2); 3,94 т. 2Н /7,4/ (3-CH_2).

Похідне левамізолу ПЛ-308 було атестовано за даними тонко шарової хроматографії та спектральними (інфрачервоний, ПМР) характеристиками.

Для дослідження левамізолу та його похідного in vitro використовували гепаринізовану кров та лімфоцити інтактних щурів-самиць. У зв'язку з тим, що левамізол є стимулятором саме клітинної та фагоцитарної ланок імунітету, а також ефективно активує міграційну здатність лейкоцитів, для порівняння дії обох сполук були використані методи, які дають змогу оцінити вплив левамізолу та його похідного на вищезазначені імунологічні показники.

Досліджували вплив сполук на: фагоцитарну активність нейтрофілів (ФІ – фагоцитарний індекс) та їх поглинаючу здатність (ФЧ – фагоцитарне число) по відношенню до тест-культури (формалінізовані пекарські дріжджі); метаболічну активність нейтрофілів в НСТ-тесті; загальну кількість Т-лімфоцитів (Т-РУК), Т-активних лімфоцитів (ЕА-РУК) у тесті розеткоутворення з еритроцитами барана та В-лімфоцитів у тесті розеткоутворення із зімозаном (В-РУК); РГМЛ (реакції гальмування міграції лейкоцитів) [4].

Сполуки брали із розрахунку доз: левамізол – 2,5 мг/кг (для людини і щурів); похідне левамізолу – 4,1 мг/кг (для людини і щурів). Наважки сполук розводили у 1000 мл 0,9 % розчині NaCl [5]. У зв'язку з тим, що похідне левамізолу розчинне у воді частково, його спочатку розводили у 0,01 мл спирту етилового, а потім у 0,9 % розчині NaCl. В якості контролю використовували 0,9 % розчин NaCl. Левамізол досліджували в концентраціях 0,150 мг/мл та 0,042 мг/мл, похідне левамізолу відповідно 0,245 мг/мл та 0,068 мг/мл. Для постановки РУК як тест-культури брали лімфоцити крові здорових щурів, які виділяли загальноприйнятим методом з гепаринізованої крові на градієнті фікол – верографин зі щільністю 1,077 г/см^3. Концентрацію клітин доводили до 4 х 10^9/л. До лімфоцитів додавали розчини сполук і після 30 хв. інкубації при температурі 37 ºС здійснювали постановку реакції розеткоутворення.

РГМЛ проводили, додаючи до гепаринізованої крові розведені сполуки у співвідношенні 1:1, потім набирали суміш у скляні капіляри, запаювали кінчики, ставили у термостат при температурі 37 ºС на 18 годин. Через 18 годин результат оцінювали під мікроскопом по площі міграції лімфоцитів, розраховуючи індекс міграції (ІМ) за формулою:

$$ІМ = \frac{\text{площа зони міграції у присутності АГ}}{\text{площа зони міграції без АГ}},$$

де АГ - антиген

При відсутності виражених змін під впливом антигенів величини індексів знаходяться в інтервалі $0,80 < ІМ < 1,20$.

Статистичний аналіз даних проводили шляхом визначення середнього арифметичного значення (Х) та його статистичної похибки (Sx) Для аналізу відмінностей використовували критерій

Ньюмена-Кейлса. Оцінку «нульових» гіпотез здійснювали на рівні значущості не більше 0,05 [6].

Результати та обговорення

Дослідження фагоцитарної ланки імунітету під впливом імуномодулюючих засобів левамізолу та його похідного показали, що обидві сполуки чинять певний вплив на ці показники (табл.1).

Таблиця 1. Показники фагоцитарної та метаболічної активності нейтрофілів, n=3, (X±Sx)

Проба	ФІ, %	ФЧ, од.	НСТ, %
Контроль	51,0±1,0	1,55±0,01	12,2±1,06
Левамізол (0,150 мг/мл)	61,0±2,01 [1)]	1,62±0,03 [1)]	23,97±1,95 [1)]
Левамізол (0,042 мг/мл)	60,7±3,05 [1)]	1,48±0,02 [1) 2)]	32,0±0,02 [1) 2)]
Похідне левамізолу (0,245 мг/мл)	65,0±2,0 [1)]	1,67±0,01 [1) 2) 3)]	18,2±1,01 [1) 2) 3)]
Похідне левамізолу (0,068 мг/мл)	68,7±3,05 [1) 2) 3)]	2,02±0,02 [1) 2) 3) 4)]	23,7±1,52 [1) 3) 4)]

[1)] Вірогідно по відношенню до контролю (p<0,05); [2)] Вірогідно по відношенню до левамізолу у концентрації 0,150 мг/мл (p<0,05)
[3)] Вірогідно по відношенню до левамізолу у концентрації 0,042 мг/мл (p<0,05); [4)] Вірогідно по відношенню до похідного левамізолу у концентрації 0,245 мг/мл (p<0,05)

Так, кількість фагоцитуючих клітин зростала під впливом левамізолу в 1, 2 рази, а його похідного - в 1,3 рази (p<0,05). Поглинаюча активність нейтрофілів (табл.1) вірогідно зростала на більшій дозі левамізолу та зменшувалася - на меншій у порівнянні з контрольною пробою (p<0,05). Похідне левамізолу, навпаки, чинило протилежний вплив на цю функцію фагоцитів: на меншій дозі спостерігали більш активну відповідь, що дає підставу говорити про ефект малих доз (p<0,05). При порівнянні дії сполук на фагоцитарну активність нейтрофілів встановлено, що похідне левамізолу впливало на їх поглинаючу активність більш ефективно.

Метаболічну активність нейтрофілів стимулювали обидві сполуки (табл.1). Встановлено, що менші дози сполук чинили більш виражений стимулюючий ефект у порівнянні з більшими дозами. Зокрема, левамізол в меншій дозі сприяв підвищенню метаболічної активності нейтрофілів у 2,7 разів, а в більшій - лише у 2 рази; похідне левамізолу відповідно у 2 та 1,5 разів (p<0,05) у порівнянні з контрольною пробою.

Отже, можна констатувати, що як левамізол, так і його похідне по відношенню до фагоцитарної та метаболічної активності нейтрофілів проявили виражений стимулюючий ефект. Однак, при порівнянні дії сполук між собою відзначаються деякі відмінності. Так, похідне левамізолу чинило більш виражений вплив на фагоцитарну активність нейтрофілів та їх поглинаючу здатність, левамізол - на метаболічну активність. Стосовно впливу на стан фагоцитів для похідного левамізолу чітко простежується ефект малих доз.

При дослідженні клітинної ланки імунітету встановлено, що преінкубація сполук з лімфоцитами впливає на кількість РУК-лімфоцитів (табл. 2). Кількість В-РУК як під впливом левамізолу, так і його похідного, зменшувалася і носила дозозалежний характер: більші дози знижували цей показник майже у 3 рази, менші - у 2 рази відносно контролю (p<0,05).

Кількість Т-РУК вірогідно підвищувалася лише під впливом більшої дози левамізолу (табл. 2). Кількість «активних» Т-лімфоцитів за даними тесту ЕА-РУК під впливом левамізолу зростала майже у 2 рази, на фоні похідного левамізолу - у 1,5 рази, що вказує на стимуляцію сполуками функціональної активності Т-лімфоцитів (p<0,05). Тобто, досліджувані сполуки за дією на Т- і В-лімфоцити подібні, проте левамізол більш активно, ніж його похідне, впливає на функціональну активність Т-лімфоцитів.

Таблиця 2. Дані щодо кількості РУК-лімфоцитів під впливом імуномодулюючих сполук, n=3, (X±Sx)

Проба	В - РУК, %	Т - РУК, %	ЕА-РУК, %
Контроль	15,0±2,0	50,0±1,0	45,0±2,0
Левамізол (0,150 мг/мл)	6,0±1,0 [1)]	59,0±3,0 [1)]	85,0±2,0 [1)]
Левамізол (0,042 мг/мл)	9,0±1,0 [1) 2)]	55,0±2,0	89,0±2,0 [1) 2)]
Похідне левамізолу (0,245 мг/мл)	5,0±0,1 [1) 3)]	54,0±2,0	67,0±2,0 [1) 2) 3)]
Похідне левамізолу (0,068 мг/мл)	8,0±1,0 [1) 2) 4)]	52,0±2,08	67,3±1,5 [1) 2) 3)]

[1)] Вірогідно по відношенню до контролю (p<0,05);[2)] Вірогідно по відношенню до левамізолу у концентрації 0,150 мг/мл (p<0,05); [3)] Вірогідно по відношенню до левамізолу у концентрації 0,042 мг/мл (p<0,05); [4)] Вірогідно по відношенню до похідного левамізолу у концентрації 0,245 мг/мл (p<0,05)

Тест РГМЛ заснований на здатності лейкоцитів периферичної крові до міграції при контакті з антигеном [7]. Якщо в інкубаційне середовище з лейкоцитами додати мітогенний антиген, вони здатні виробляти фактор, затримуючий їх міграцію. Проте деякі антигени можуть викликати стимуляцію міграції лейкоцитів. РГМЛ застосовують у клініці з метою оцінки клітинного імунітету для виявлення сенсибілізації під впливом антигену. За допомогою РГМЛ можна виявити підвищену чутливість повільного типу до металів, лікарських засобів, алергенів тощо [8].

При дослідженні впливу левамізолу та його похідного на міграційну здатність лейкоцитів встановлено, що обидві сполуки здатні стимулювати цю функцію лейкоцитів (табл.3). Проте левамізол чинив більш виразний вплив щодо стимулювання міграційної активності лейкоцитів, ніж похідне левамізолу: показник ІМ незалежно від концентрації левамізолу перевищував значення контролю більше, ніж у 3 рази (табл.3). Під впливом похідного левамізолу ІМ лейкоцитів підвищувався в залежності від концентрації сполуки відповідно в 1,33 та 1,92 разів по відношенню до контролю ($p<0,05$). У той же час, порівняно з левамізолом дія його похідного на цей показник була в середньому майже у 2 рази меншою.

Слід зазначити, що здатність лікарських засобів, алергенів тощо до значної стимуляції міграції лейкоцитів може свідчити також про наявність у них алергічних властивостей. З огляду на це, можна стверджувати, що похідне левамізолу проявило меншу здатність до сенсибілізації порівняно з левамізолом.

Таблиця 3. Показники міграції лейкоцитів під впливом імуномодулюючих сполук, n=3, (X±Sx)

Проба	Площа міграції, у.о.	ІМ, од.
Контроль	12,0±1,0	1,00±0,0
Левамізол (0,150 мг/мл)	39,0±2,0 [1)]	3,3±0,2
Левамізол (0,042 мг/мл)	38±3,0 [1)]	3,2±0,3
Похідне левамізолу (0,245 мг/мл)	23±1,0 [1) 2) 3)]	1,9±0,3
Похідне левамізолу (0,068 мг/мл)	16±1,0 [1) 2) 3) 4)]	1,3±0,2

[1)] Вірогідно по відношенню до контролю ($p<0,05$); [2)] Вірогідно по відношенню до левамізолу у концентрації 0,150 мг/мл ($p<0,05$); [3)] Вірогідно по відношенню до левамізолу у концентрації 0,042 мг/мл ($p<0,05$); [4)] Вірогідно по відношенню до похідного левамізолу у концентрації 0,245 мг/мл ($p<0,05$)

Отже, за даними досліджень in vitro щодо впливу левамізолу та його похідного на імунологічну реактивність можна констатувати, що похідне левамізолу також чинить імуномодулюючу дію на клітинну та фагоцитарну ланки імунітету. Враховуючи той факт, що ряд захворювань, які протікають на тлі хронічного запального процесу або з аутоімунним компонентом і супроводжуються саме зниженням фагоцитарної активності та поглинаючої здатності нейтрофілів [9], активація саме цієї ланки імунітету під впливом похідного левамізолу є важливим позитивним ефектом сполуки. Зниження В-РУК під впливом левамізолу і його похідного в подальшому може чинити вплив на зменшення синтезу аутоантитіл. Відомо, що рецептори до еритроцитів барана відносять до СД2 антигенів, які несуть на своїй поверхні Т-лімфоцити, натуральні кілери [10, 11]. Активація цих клітин має велике значення для контролю балансу компонентів внутрішнього середовища, захисту від новоутворень, надлишкового синтезу аутоантитіл [12]. З огляду на це, здатність левамізолу та його похідного стимулювати функціональну активність Т-лімфоцитів є важливою стороною їх дії.

Для отримання терапевтичного ефекту від прийому лікарських засобів необхідною умовою є їх тривале застосування, тобто, чим менша здатність препарату до сенсибілізації, тим більш безпечний він для організму і тому його можна призначати на більш тривалий термін. Знижена здатність похідного левамізолу до стимуляції міграційної активності лейкоцитів може свідчити про наявність менш виражених сенсибілізаційних властивостей даної сполуки у порівнянні з левамізолом.

Таким чином, проведені дослідження щодо впливу левамізолу та його похідного на складові імунологічної резистентності в умовах in vitro свідчать про схожість дії сполук по відношенню до Т- та В-лімфоцитів, метаболічної та функціональної активності нейтрофілів. Проте, досліджені сполуки мають відмітні особливості, про що свідчить деяка відмінність в їх активності.

Висновки

1. Сполуки з імуномодулюючими властивостями левамізол та його похідне в дослідах in vitro чинять стимулюючий вплив на клітинну, фагоцитарну ланки
2. Відмінність в активності сполук полягає в тому, що левамізол більш ефективно підвищує міграцію лейкоцитів та функціональну активність Т-лімфоцитів, а похідне левамізолу - поглинаючу

Література

1. Savinov F.Y., Strongin A.Y. Defining the roles of T-cell membrane proteinase and CD44 in type 1 diabetes // IUBMB Life. - 2007. - Vol. 59, N 1. - P. 6 - 13.
2. Машковский, М. Д. Лекарственные средства. Руководство для врачей / М. Д. Машковский. – М.: «Новая волна»: Издатель Умеренков, 2008. - с.740 - 741.
3. The Merck Index. An encyclopedia of chemicals, drugs, and biologicals / 13-th edit. – NJ. : Merck & Co., Inc., 2001. – 1818 p.
4. Иммунологические методы / Пер. с нем. Под ред. Г. Фримеля -М. : Медицина, 1987. - 472 С.
5. Патент 22360 А UA, МПК G 01 N 33/53. Спосіб диференційної оцінки впливу лікарських препаратів на організм людини / В. В. Козар, І. І. Топчій (UA); В. В. Козар (UA). - № 97031469; заявл. 28.03.97; опубл. 30.06.98, Бюл. № 3 - 8 с.
6. Атраментова, Л. О., Утевська О. М. Статистичні методи в біології: Підручник / Х. : ХНУ ім. В. Н. Каразіна, 2007. – 288 с.
7. Артемова А. Г. Феномен торможения миграции лейкоцитов крови у морских свинок с гиперчувствительностью замедленного типа к чужеродному тканевому антигену // Бюлл. експер. биол. и мед. - 1973. - № 10. - С. 67 - 71.
8. Реакция торможения миграции клеток с применением капилляров медицинских многоканальных : Метод. рекомендации / М-во здравоохранения РСФСР ; [авт. чл. кор. АМН СССР проф. Н. Г. Астафьева и др.] - Саратов, 1987. - 17 с.
9. Heinecke J.W. The role of myeloperoxidase in HDL oxidation and aterogenesis // Curr. Atheroscler. Rep. - 2007. - V. 9, N 4. - P. 249 - 251.
10. Carabasi, M. H., DiSanto J. P., Yang S. Y., Dupont B. Activation of peripheral CD8+ T lymphocytes via CD28 plus CD2: evidence for IL-2 gene transcription mediated by CD28 activation // Tissue Antigens. - 1991. - Vol. 37, N 1. - P. 26 - 32.
11. Dissen E., Fossum S., Hoelsbrekken S. E., Saether P. C. NK cell receptors in rodents and cattle [Electronic resourse] // Режим доступа : http://www.sciencedirect.com/science_
12. Shinbori T., Walczak H., Krammer P. H. Activated T killer cells induce apoptosis in lung epithelial cells and the release of pro-inflamatory cytokine TNF-alfha // Eur. J. Immunol. - 2004. - Vol. 34, N 6. - P. 1762 - 1770.

УДК 612-083/612.017→612.014.16

ВПЛИВ СПОЛУК З РЯДУ ІМІДАЗО[2,1-b]ТІАЗОЛІВ НА ПОКАЗНИКИ ІМУНОЛОГІЧНОЇ РЕЗИСТЕНТНОСТІ В УМОВАХ IN VITRO

Козар В. В., Кудря М. Я.,. Павленко Т. О, Сова О.М., Яременко Ф. Г

Досліджено вплив левамізолу та його похідного на клітинну і фагоцитарну ланки імунітету, міграційну здатність лейкоцитів в умовах in vitro. Встановлено, що сполуки подібні за дією по відношенню до Т- і В-лімфоцитів, метаболічної та фагоцитарної активності лейкоцитів. Відмінність полягає у тому, що похідне левамізолу більш ефективно стимулювало поглинаючу здатність гранулоцитів, а левамізол - міграційну активність лейкоцитів.

Ключові слова: левамізол, похідне левамізолу, Т-лімфоцити, В-лімфоцити, фагоцитоз, міграційна здатність лейкоцитів

УДК 612-083/612.017→612.014.16

ВЛИЯНИЕ СОЕДИНЕНИЙ ИЗ РЯДА ИМИДАЗО[2,1-b]ТИАЗОЛОВ НА ПОКАЗАТЕЛИ ИММУНОЛОГИЧЕСКОЙ РЕЗИСТЕНТНОСТИ В УСЛОВИЯХ IN VITRO

Козарь В. В., Кудря М. Я.,. Павленко Т. А, Сова А. М., Яременко Ф. Г.

Изучено влияние левамизола и его производного на клеточное и фагоцитарное звенья иммунитета, миграционную способность лейкоцитов в условиях in vitro. Установлено, что соединения похожи по действию в отношении Т- и В-лимфоцитов, метаболической и фагоцитарной активности лейкоцитов. Отличие состоит в том, что производное левамизола более эффективно стимулировало поглотительную способность гранулоцитов, а левамизол - миграционную способность лейкоцитов.

Ключевые слова: левамизол, производное левамизола, Т-лимфоциты, В-лимфоциты, фагоцитоз, миграционная способность лейкоцитов.

УДК 612-083/612.017→612.014.16

INFLUENCE OF COMPAUNDS SERIES IMIDAZO [2,1-b]TIAZOLES ON THE IMMUNE RESISTANCE INDEXES IN VITRO

Kozar V. V., Kudrya M. Y., Pavlenko T. O, Sova O.M., Yaremenko F. G.

The influence of levamisole and its derivative on the cellular, on the phagocyte link of immunity, on the leukocytes` migration faculty in the conditions in vitro has been studied. It has been revealed that the compounds are similar in action towards T- and B-lymphocytes, metabolic and phagocyte activity of leucocytes. The difference is that the levamisole derivative is more efficient in stimulating the absorbent faculty of granulocytes, and levamisole in stimulating migration activity of leucocytes.

Key words: levamisol, levamisole derivative, T-lymphocytes, B-lymphocytes, phagocytosis, migrantion activity of leucocytes.