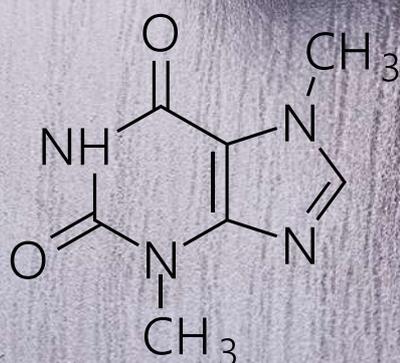
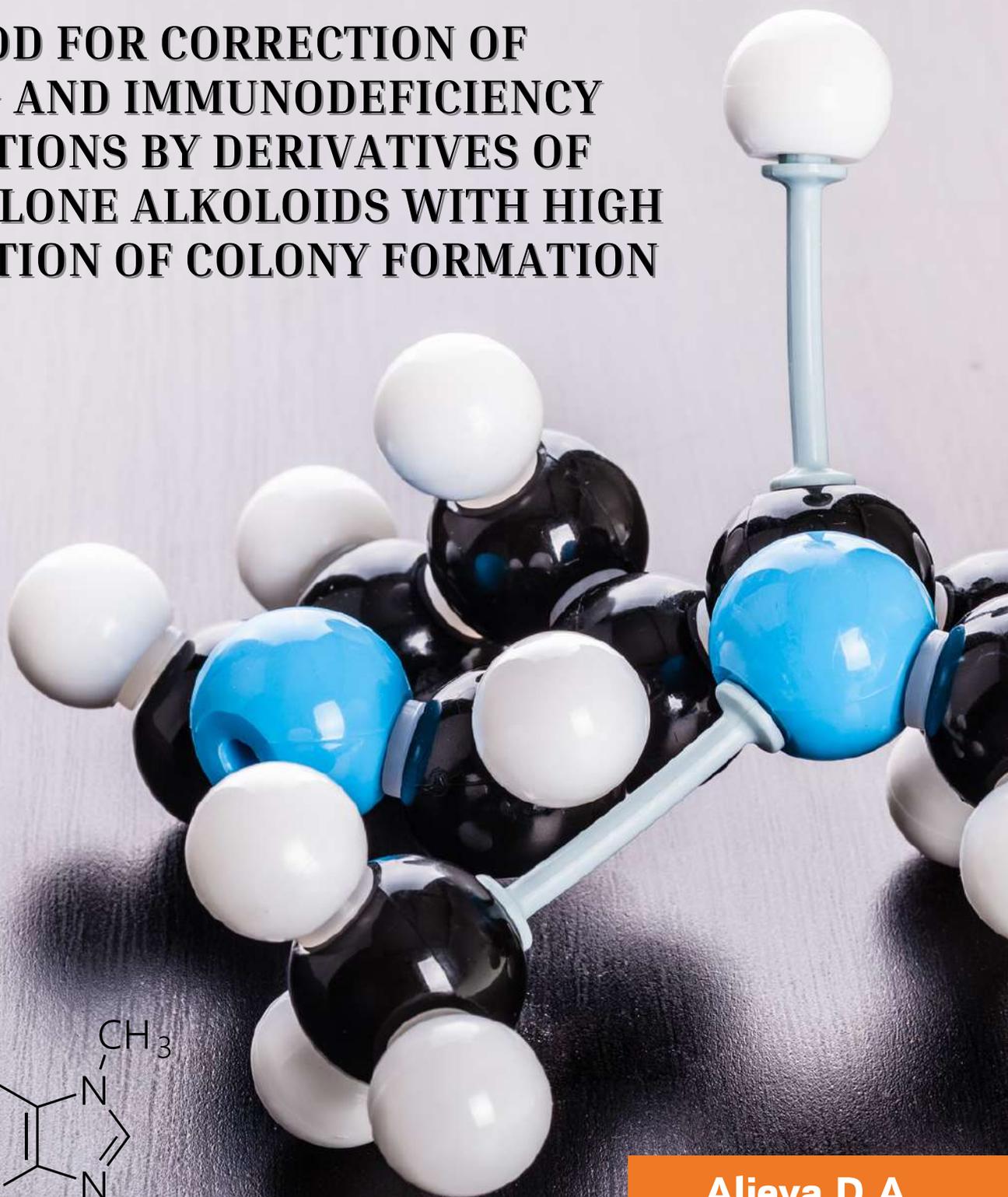
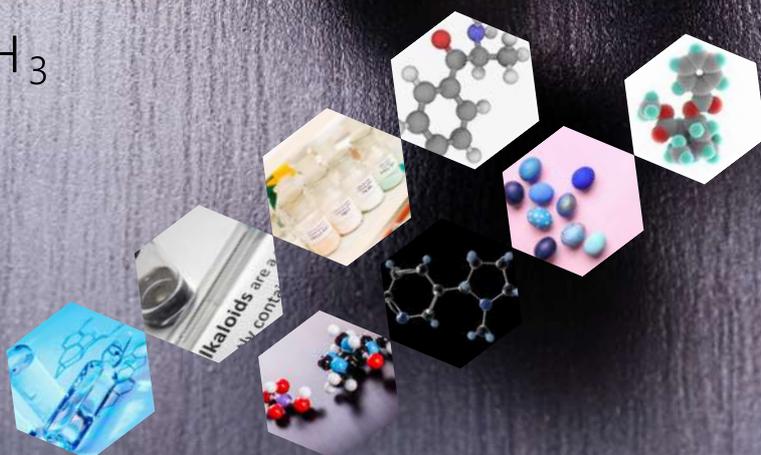


ISBN: 978-93-90753-15-4

METHOD FOR CORRECTION OF HEMO- AND IMMUNODEFICIENCY CONDITIONS BY DERIVATIVES OF TROPOLONE ALKOLOIDS WITH HIGH INDUCTION OF COLONY FORMATION



**Alieva D.A.,
Enikeeva Z.M.,
Mavlyanova Z.F.**



Published by
Novateur Publication
466, Sadashiv Peth, M.S.India-411030

**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ
УЗБЕКИСТАН**

**САМАРКАНДСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ
УНИВЕРСИТЕТ**

**РЕСПУБЛИКАНСКИЙ НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКИЙ ЦЕНТР
СПОРТИВНОЙ МЕДИЦИНЫ ПРИ НАЦИОНАЛЬНОМ ОЛИМПИЙСКОМ
КОМИТЕТЕ УЗБЕКИСТАНА**

**РЕСПУБЛИКАНСКИЙ СПЕЦИАЛИЗИРОВАННЫЙ НАУЧНО-
ПРАКТИЧЕСКИЙ
МЕДИЦИНСКИЙ ЦЕНТР ОНКОЛОГИИ И РАДИОЛОГИИ**

АЛИЕВА Д.А., ЕНИКЕЕВА З.М., МАВЛЯНОВА З.Ф.

**СПОСОБ КОРРЕКЦИИ ГЕМО- И
ИММУНОДЕФИЦИТНЫХ СОСТОЯНИЙ
ПРОИЗВОДНЫМИ ТРОПОЛОНОВЫХ
АЛКОЛОИДОВ С ВЫСОКОЙ ИНДУКЦИЕЙ
КОЛОНИЕОБРАЗОВАНИЯ**

Индия – 2022 г

**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ
УЗБЕКИСТАН**

**САМАРКАНДСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ
УНИВЕРСИТЕТ**

**РЕСПУБЛИКАНСКИЙ НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКИЙ ЦЕНТР
СПОРТИВНОЙ МЕДИЦИНЫ ПРИ НАЦИОНАЛЬНОМ
ОЛИМПИЙСКОМ КОМИТЕТЕ УЗБЕКИСТАНА**

**РЕСПУБЛИКАНСКИЙ СПЕЦИАЛИЗИРОВАННЫЙ НАУЧНО-
ПРАКТИЧЕСКИЙ
МЕДИЦИНСКИЙ ЦЕНТР ОНКОЛОГИИ И РАДИОЛОГИИ**

**СПОСОБ КОРРЕКЦИИ ГЕМО- И ИММУНОДЕФИЦИТНЫХ
СОСТОЯНИЙ ПРОИЗВОДНЫМИ ТРОПОЛОНОВЫХ
АЛКОЛОИДОВ С ВЫСОКОЙ ИНДУКЦИЕЙ
КОЛОНИЕОБРАЗОВАНИЯ**

(монография)

Индия – 2022

Д.А. Алиева, З.М. Еникеева, З.Ф. Мавлянова. Способ коррекции гемо- и иммунодефицитных состояний производными трополоновых алколоидов с высокой индукцией колониеобразования. Монография. 2022 год

Составители: **Д.А. Алиева** - к.м.н., заведующий отделом научных исследований и подготовки научно-педагогических кадров РНПЦСМ при НОК Узбекистана

З.М. Еникеева - д.б.н., профессор РСНПМЦОиР при МЗ РУз

З.Ф. Мавлянова - заведующая кафедрой медицинской реабилитации, спортивной медицины и народной медицины Самаркандского государственного медицинского университета, к.м.н., доцент

Рецензенты: **С.Н. Наврузов** - д.м.н., профессор кафедры Онкологии с курсом УЗИ Ташкентского института усовершенствования врачей

Н.Х.Рахимов - заведующий кафедрой онкологии Самаркандского государственного медицинского университета, DSc, доцент

Данная монография разработана с целью представления собственных научных исследований, освещения труда многолетней работы научных сотрудников, проводимой в РСНПМЦОиР Республики Узбекистан по модификации колхицина, из которого в настоящее время выделено большое количество новых веществ: 4 активных соединения - К-20, К-42, К-61 и К-48. На основе использования современных методов исследования и экспериментов изучены способность веществ к индукции образования селезеночных колоний (КОЕс), их высокая эффективность, что послужило предпосылкой для их отбора и последующего поиска с детальным изучением свойств, которые в последующем позволят применять их в качестве веществ для коррекции гемо- и иммунодефицитных состояний, возникающих при большинстве заболеваний, в том числе и онкопатологии. В монографии представлены результаты исследований ряда активных веществ, с проведением их отбора, как наиболее активных по способности к колониеобразованию в селезенке (КОЕс), подбора эффективных доз и способов их введения, с изучением возможной их иммуномодулирующей и гемостимулирующей активности.

Монография предназначена для студентов, докторантов медицинских, фармацевтических ВУЗов, научных исследователей, врачей общей практики, онкологов и других специалистов.

Монография рассмотрена на Центральной научно-проблемной комиссии Самаркандского государственного медицинского университета и рекомендована к публикации 25 мая 2022 г., протокол № 5

Монография рассмотрена на Ученом Совете Самаркандского государственного медицинского университета и рекомендована к публикации 25 мая 2022 г., протокол 10

СОДЕРЖАНИЕ

СПИСОК УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ	6
ВВЕДЕНИЕ	7
Глава I. СОЗДАНИЕ И РАЗРАБОТКА НОВЫХ ПРЕПАРАТОВ ИЗ РАСТИТЕЛЬНОГО СЫРЬЯ	9
1.1. Общие принципы экспериментального изучения и испытания новых биологически активных веществ	9
Глава II. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ИЗУЧЕНИЕ. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	16
Глава III. РЕЗУЛЬТАТЫ ПРОВЕДЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ ПО ИЗУЧЕНИЮ МЕХАНИЗМОВ ДЕЙСТВИЯ НОВЫХ ПРОИЗВОДНЫХ	25
3.1. Получение новых производных трополоновых алкалоидов	25
3.2. Определение способности к колониеобразованию КОЕс исследуемыми соединениями в разных концентрациях и способах введения.....	34
3.3. Отбор соединений из 4-х К-48, К-42, К-20 и К-60 по наиболее значительной способности к колониеобразованию КОЕс в разных дозах.....	35
3.4. Изучение влияния К-48 на восстановление состояния периферической крови после лучевого воздействия.....	47
3.5. Изучение влияния К-48 клеточный состав селезенки (спленограмма) после лучевого воздействия.....	49
3.6. Изучение влияния к-48 на периферическую кровь у животных-опухоленосителей с перевивным штаммом Саркома – 180.....	50
Глава IV. ИЗУЧЕНИЕ ИММУНОМОДУЛИРУЮЩЕГО ДЕЙСТВИЯ ПРЕПАРАТА НА ЖИВОТНЫХ-ОПУХОЛЕНОСИТЕЛЯХ IN VIVO И В СИСТЕМЕ IN VITRO . . .	57
4.1. Изучение противоопухолевой активности новых соединений К-42 и К-48.....	57
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	73
ВЫВОДЫ	77
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ	80
ПРИЛОЖЕНИЕ. Определение числа АОК	82
Стволовые кроветворные клетки: общие сведения	85

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

АОК	антителообразующие клетки
ИКК	иммунокомпетентные клетки
ИРИ	иммунорегуляторный индекс
ИТ	Иммунотерапия
К-48	новое производное колхицина
КОЕс	колониеобразующие единицы селезенки
КСФ	колониестимулирующий фактор
ЛД	летальная доза
МКАТ	моноклональные антитела
МПД	максимально переносимые дозы
СКК	стволовые кроветворные клетки
СМЛ	спонтанная миграция лимфоцитов
СМ ЛПК	спонтанная миграция лимфоцитов периферической крови
ТСХ	тонкослойная хроматография
ФУМ	фактор угнетения миграции
ФСМ	фактор стимуляции миграции
CD16	натуральные киллерные клетки
CD4	Т-хелперы
CD8	Т-супрессоры
CD19	В-лимфоциты
NCI	Национальный институт рака США

ВВЕДЕНИЕ

Исследование новых соединений, обладающих высокой противоопухолевой активностью, которые могут быть использованы в качестве не только химиотерапевтических (ХТ) средств, но и в разных дозах и способах введения ещё и проявлять действие на иммуно- и гемопоз является одним из перспективных направлений химии, фармакологии и онкологии [1,2].

Если обратиться к истории науки, то в ней можно найти достаточно примеров, констатирующих о том, что новые постулаты или теоретически и экспериментально доказанные данные, либо зародившаяся новая дисциплина, в которой имеются и описаны какие-либо новые феномены, с большой сложностью и огромными преградами на пути получают научный статус и дальнейшее развитие. Большинство ученых из научного мира с опаской относятся к новым теоретическим концепциям, принципам и полученным экспериментальным путем данным, и закономерностям, отрицая возможность полученных результатов экспериментов, что в последующем нередко приводит к тому, что исследователи, не находя понимания и поддержки закрывают и завершают начатые первые шаги, что в последующем препятствует развитию нового направления - его теоретического и экспериментального базиса.

В Республиканском Центре онкологии и радиологии МЗ РУз на протяжении многих лет в лаборатории д.б.н., профессора Еникеевой З.М. ведутся исследования по синтезу и изучению различных видов активностей новых производных трополоновых алкалоидов колхицина и колхамина, которые в настоящее время получают из местного растительного сырья. Несмотря на имеющиеся положительные результаты новых соединений, выраженную противоопухолевую активность доведение данных препаратов до их промышленного выпуска затягивается в связи с большой преградой, существующей при подготовке огромного количества документаций по ВФС препаратов, их патентированию, а

www.novateurpublication.com

также имеющимся «противникам», которые не находят научности в экспериментально полученных данных, не видя развития в продвижении и выпуске препаратов, констатируя длительный период изучения за который проведена большая работа, но нет конечного результата, при этом навешивая ярлыки отсутствия научного подхода и специального затягивания проектов, направленных на получение лишь личной выгоды. Но, хотим Вас уверить, и выразить огромную благодарность экспертам, которые проводят оценку научных разработок и подчеркивают важность создания противоопухолевых препаратов такого класса, оказывающих поддержку, как со своей стороны, так и со стороны Государства нашей республики, которые содействовали выполнению научных разработок новых лекарственных средств, обладающих широким спектром действия и дают положительные отзывы о проделанной работе, которая длится уже на протяжении не одного десятка лет и продолжается по настоящее время.

ГЛАВА I. СОЗДАНИЕ И РАЗРАБОТКА НОВЫХ ПРЕПАРАТОВ ИЗ РАСТИТЕЛЬНОГО СЫРЬЯ

1.1. Общие принципы экспериментального изучения и испытания новых биологически активных веществ

Реализация жестких требований современной фармакотерапии – минимальные дозы препаратов обеспечить оптимальный терапевтический эффект без побочных явлений возможно лишь при тщательном изучении новых лекарственных препаратов с проведением доклинических и клинических исследований [11, 13,28,30].

Доклиническое (экспериментальное) исследование биологически активных веществ условно делят на: фармакологическое и токсикологическое, которые взаимозависимы и основаны на одних и тех же научных принципах. Изучение острой токсичности потенциальных фармакологических веществ дают информацию для проведения следующих этапов исследования, определяющих степень и продолжительность изучения хронической токсичности вещества.

Целью фармакологических исследований является определение терапевтической эффективности изучаемого вещества – будущего лекарственного средства, его влияние на основные системы организма, выявление побочных эффектов, связанных с их фармакологической активностью. Очень важным является поиск возможных взаимодействий активных веществ препарата с другими лекарственными средствами [7,9,11]. Первоначальным в фармакологическом исследовании является постановка и поиск экспериментальной модели заболевания или патологического состояния с применением однократных вводимых, постоянно возрастающих доз веществ, на основании которых проводится подбор дозы, оказывающий необходимый терапевтический эффект.

Начальные исследования свойств веществ могут дать определенные представления о токсичности веществ, которые в последующем должны

изучаться с помощью специальных общепринятых исследований по токсикологии препарата [5,12,18,27].

Изучение токсикологических свойств новых препаратов позволяет выявить характер и выраженность возможного повреждающего действия на организм экспериментальных животных. Данные исследования проводится в 4 этапа:

- на I-этапе изучают основные виды фармакологической активности на нескольких экспериментальных животных;

- на II-этапе проводится изучение острой токсичности препаратов при однократном применении с определением LD₅₀;

- на III-этапе проводится изучение хронической токсичности соединений и их воздействие на внутренние органы, мозг, кости и др. системы;

- на IV-этапе изучается специфическая токсичность фармакологического действия препаратов.

Данные исследования проводится в специализированных, оборудованных лабораториях и являются достаточно дорогостоящими, так как в процессе определения и выполнения вышеуказанных этапов используется большое число экспериментальных животных, а также проводится специфические исследования по изучению фармакокинетики и фармакодинамики.

Экспериментальные доклинические изучения новых средств (фармацевтические, фармакологические и токсикологические свойства) проводятся по стандартным унифицированным методикам, описанных в методических рекомендациях Фармакологического комитета и должны отвечать требованиям Good Laboratory Practice (GLP) – Надлежащей Лабораторной Практики (НЛП). Но, учитывая тот факт, что этим требованиям существующие лаборатории в РСНПМЦОиР МЗ РУз в недостаточной мере соответствуют, это затрудняет проведение

экспериментальных исследований и затягивает процесс получения полноценной информации по экспериментальным разработкам [18,25,29].

Исследования, запланированные в данном проекте, проводились согласно этапам, являющиеся общепринятыми. На первом этапе проведена наработка сырья, которое выделяется экстрагированием из растения *Merendera robusta* действующего вещества с последующим поэтапным синтезом новых соединений, в частности К-20, К-42, К-48, К-61, представляющими собой достаточно сложный и емкий процесс, который занимает много времени с учетом этапности получения активных веществ, а также неудовлетворительного материально-технического обеспечения лаборатории.

В лаборатории по разработке противоопухолевых препаратов РСНПМЦОиР МЗ РУз д.б.н, проф. Еникеевой З.М. на протяжении ряда лет ведется работа по синтезу новых биологически активных веществ, обладающих высоким противоопухолевым эффектом. В настоящее время получен большой ряд оригинальных веществ на основе митозтормозящих алкалоидов колхицина и колхамина [1,5,8], которые обладают значимо меньшей токсичностью и высокой противоопухолевой активностью, что связано с сочетанием антимитотического (тубулининтерактивного) и алкилирующего механизмов их действия. Однако факты, полученные экспериментально указывают на их возможное иммуномодулирующее действие и способность к индукции стволовых кроветворных клеток.

Изыскание новых противоопухолевых препаратов с улучшенными параметрами действия, чем существующие, является одним из ведущих направлений в создании более совершенных методов лечения злокачественных новообразований. Клиническая онкология располагает большим рядом эффективных препаратов, однако, их выраженный общетоксический эффект, быстро развивающаяся резистентность организма к ним, а также разнообразие форм онкологических заболеваний диктует необходимость расширения арсенала действующих препаратов.

Кроме того, как правило, противоопухолевые препараты обладают миелотоксичностью, а также подавляют иммунную систему. В этой связи, несомненной и актуальной задачей является создание новых противоопухолевых препаратов, не подавляющих, а стимулирующих иммунную систему, кроме этого, не проявляющих гематотоксичного эффекта. Несомненно, высоким остается интерес к малотоксичным веществам небольшого молекулярного веса, которые могут быть индукторами цитокинов и вызывать в организме процессы, ведущие к доминирующему образованию определенного ростка кроветворения [5,8,27,29].

Современная стратегия противоопухолевой иммунотерапии (ИТ) базируется на огромном фактическом материале и детальном изучении различных способов, с помощью которых иммунная система в нормальном организме уничтожает постоянно возникающие в течение жизни опухолевые клетки. При разработке методов противоопухолевой терапии широко используются достижения в области молекулярной и клеточной биотехнологии. Однако следует отметить, что пока ни в одном из направлений противоопухолевой ИТ не достигнуто конечного (оптимального) результата и многие из предлагаемых способов или еще не внедрены в клиническую практику, или недостаточно широко и долго применяются для того, чтобы сделать однозначное заключение об их эффективности [1].

Обнаружение у ряда новых веществ способности к выраженному колониобразованию в селезенке, что в наибольшей степени выражено у К-48 явилось неожиданностью, которая, с одной стороны, несколько проясняет феномен получения противоопухолевого препарата с отсутствием у него иммуносупрессивных свойств и отрицательного воздействия на костный мозг. Это требует объяснений механизмов их возникновения - каким образом вещество, с выраженной противоопухолевой активностью не только не ингибирует клетки костного

мозга, но и способствует активации интенсивного размножения и дифференцировке СКК.

Для выяснения механизмов действия новых соединений проведено детальное изучение показателей иммунной системы, которое включало: определение общего количества лейкоцитов, и их фенотипирования с помощью моноклональных антител (МКАТ) CD4, CD8, CD16, CD19, CD95, фагоцитарную активность нейтрофилов, спонтанную миграцию лимфоцитов (СМЛ) периферической крови, активность сывороточных цитокинов, активность Т-лимфоцитов.

Кроме того, есть основания предполагать, что синтезированные соединения обладают способностью инициировать рецептор интерлейкина-2, что в свою очередь активирует специфический противоопухолевый иммунитет, либо доводит незрелые дендритные клетки, способствуя их созреванию до зрелых.

Видимо К-48, обладая способностью стимулировать увеличение количества колоний в селезенке, индуцирует также их дифференцировку в определенную сторону, в связи с чем, одной из задач явилось изучение в эксперименте возможности стимуляции новыми перспективными соединениями пула стволовых кроветворных клеток (СКК) после лучевого воздействия, а также возможности К-48 разнонаправлено влиять на процессы индукции СКК.

Основными этапами реализации проекта было следующее:

Выделение и наработка препаратов для проведения экспериментальных исследований, последующее определение активности препарата в плане стимуляции колониеобразования (КОЕс), отбор наиболее активных, подробное изучение воздействия препарата на параметры иммунной и кроветворной системы:

1. Определение общего количества лейкоцитов, и их фенотипирования с помощью МКАТ CD4, CD8, CD16, CD19;
2. Определение фагоцитарной активности нейтрофилов;

3. Определение СМЛ периферической крови;
4. Определение активности СЦ (сывороточных цитокинов);
5. Определение активности Т-лимфоцитов.

Подробное изучение ростков стволовых кроветворных клеток, что в последующем даст возможность использовать препарат в качестве гемо- и иммунокорректора, стимулирующего определенные ростки кроветворения после проведения химиолучевой терапии у онкологических больных.

Согласно плану поставленных задач выполнено:

1. Из растения *Merendera robusta*, проэкстрагировали этанолом 35 кг сухого растения. Далее из полученного спиртового экстракта проводилось выделение колхицина (метод приведен ниже). Согласно плану исследования получено 12г колхицина-сырца (технического колхицина) после хроматографической очистки - 10 г колхицина (выход, считая на растение - 0,03%, считая на технический колхицин – 34,4%) и 2 г. колхамина.
2. Из фармакопейного колхицина препаративно получены новые соединения К-48 - 0,68г., К-20 - 1,2г., из колхамина - К-42 - 0,5г., К-61 - 0,45г.
3. Из 4-х полученных соединений отобраны два активных, показавших при определении высокий уровень КОЕс.
4. Проведено определение способности к колониеобразованию КОЕс исследуемых 4 препаратов в разных концентрациях.
5. Проведено подробное изучение воздействия препарата на параметры иммунной системы, для чего определены - общее количество лейкоцитов и их фенотипирование с помощью:
 - МКАТ CD4, CD8, CD16, CD19
 - Определение фагоцитарной активности нейтрофилов,
 - Определение СМЛ периферической крови,
 - Определение активности СЦ (сывороточных цитокинов),
 - Определение активности Т-лимфоцитов

Согласно плану поставленных задач выполнено:

1. Изучение токсичности веществ, их влияния на КОЭс в дозе 1 мг/кг перорально у экспериментальных животных. Произведен отбор препаратов в зависимости от способности к колониеобразованию в селезенке.
2. Проведены опыты по изучению токсичности препаратов при пероральном способе их введения, с определением LD₅₀, которые показали, что новые соединения К-42 и К-48 при пероральном применении проявляют токсическое действие при более высоких концентрациях, в отличие от их внутрибрюшинного применения. В связи с выявленной низкой токсичностью препарата при пероральном использовании необходимым было изучение их биологических свойств при этом способе применения.
3. Проведено изучение противоопухолевой активности препаратов с изучением иммунологических параметров.
4. Полученные предварительные экспериментальные данные выявили высокую активность препаратов, которую в дальнейшем можно будет использовать для проведения следующего этапа - предклинических испытаний, с целью создания новых препаратов, способствующих коррекции состояний нарушенных гемо- и иммунопозза у онкологических больных, после проведения спец. терапии.

ГЛАВА II. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ИЗУЧЕНИЕ. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

УФ-спектры соединений снимали на приборе фирмы "Перкин Эльман", в этаноле ($l=1,0$ см, $C = 10^{-3}$ М). ИК-спектры снимали на спектрометре Фурье 2000 фирмы "Перкин Эльман", в таблетках KBr. ПМР-спектры - на приборе XL-100 Varian в $CDCl_3$, внутренний стандарт – гексаметилдисилоксан.

Использовали ТСХ на: а) закреплённом слое окиси алюминия; б) закреплённом слое силикагеля ЛС 5/40 М для ТСХ с 13% гипса; в) пластинках Silufol. Системы растворителей: I - хлороформ: метанол 24:1; II - хлороформ : бензол : ацетон : метанол 20:5:4:3; III - хлороформ : бензол : ацетон : метанол 20:5:4:8; IV - хлороформ : гептан : метанол 20:5,5:3,5. В качестве проявителей применяли реактив Драгендорфа, пары йода.

В работе были использованы белые беспородные мыши, а также мыши линии BALB/c ($n=120$).

Изучение влияния соединений на численность эндогенных колониеобразующих единиц в селезенке (КОЕс) с дальнейшим определением числа микроколоний различного гистологического типа проводили на мышах линии BALB/c на аппарате "АГАТ-РМ" с мощностью 52,8 сГр/мин, источник Co^{60} в сублетальной дозе, равной 6 Гр на 9-е сутки после облучения [22].

После извлечения селезенок и подсчета колоний производили их фиксацию в жидкости Буэна, после чего производили подсчет микроколоний различного гистологического типа на 3 срезах органа (2 субкапсулярных и 1 центральном).

Изучение влияния соединений на численность эндогенных колониеобразующих единиц в селезенке (КОЕс) с дальнейшим определением клеточности селезенок и костного мозга (спленограмма, миелограмма) проводили на 30 мышах линии BALB/c обоего пола, средней массой – 22 гр, на 7-е сутки после облучения. Облучение

проводили на аппарате «THERATRON» с мощностью 112 с Гр/мин, источник Co^{60} в субтотальной дозе равной 6 Гр. Препарат К-48 вводили опытной группе через 2 часа после субтотального облучения однократно, в дозе 1 мг/кг внутрибрюшинно. Через 7 дней мышей забивали декапитацией и извлекали у них тимус, селезенку.

Определяли массу селезенки и тимуса, производили подсчет количества макроколоний в селезенке.

Изучение влияния соединений на численность антителообразующих клеток проводили на мышах линии BALB/c с перевивным опухолевым штаммом Саркома-180 путем определения численности антителообразующих клеток (АОК) в селезенке с помощью метода локального гемолиза эритроцитов по Erne и Nordin, в модификации [20,21,22]. После 8-кратного внутрибрюшинного введения исследуемых веществ в терапевтических дозах, на 15-е сутки после перевивки опухоли, животных иммунизировали 2×10^8 отмытыми эритроцитами барана путем введения в хвостовую вену в объеме 0,5 мл. Через 4 дня после введения антигена животных забивали декапитацией, извлекали селезенку, взвешивали и гомогенизировали в стеклянном гомогенизаторе в растворе Хенкса (рН 7,2-7,4). Взвесь клеток профильтровывали через 2 слоя капронового фильтра. К 0,1 мл взвеси добавляли 0,1 мл (2×10^8) эритроцитов барана и 2,5 мл агара фирмы Difco (0,8%). Смесь тщательно перемешивали и выливали в чашки Петри. Содержимое чашек инкубировали при $37^{\circ}C$ в течение 1 часа. После этого добавляли 4 мл сухого компонента морской свинки, разведенного в 5 раз 0,9% раствором хлористого натрия и реинкубировали еще 1 час. В чашках подсчитывали количество АОК, которые определяли по наличию зон гемолиза и рассчитывали на весь объем селезенки.

Подсчет числа розеткообразующих клеток (РОК) в селезенке проводили согласно методу описанному Jondal 1972. Мышей иммунизировали ЭБ в дозе 2×10^8 . На 4-е сутки брали клетки селезенки,

двукратно отмывали центрифугированием при 1000 оборотах в течение 10 минут и доводили их концентрацию до 2×10^6 в 1 мл, после чего смешивали с ЭБ в соотношении 1:50 (0,1 мл спленоцитов + 0,1 мл ЭБ), после чего ставили реакцию розеткообразования.

Для определения фагоцитарной активности лейкоцитов мышей в экспериментах в качестве инородного тела использовали частицы латекса размером 1-1,5 мкм в концентрации 10^8 частиц/мл. В пробирки помещали 0,1 мл стабилизированной крови мышей и 0,1 мл суспензии латекса, перемешивали и ставили на 30 минут в термостат, при температуре $+37^\circ\text{C}$. После этого содержимое перемешивали, центрифугировали при 1000 оборотах в течение 5 минут. Часть надосадка удаляли, из осадка готовили мазки на предметных стеклах, фиксировали метанолом и окрашивали по Романовскому-Гимзе.

Рассчитывали три показателя фагоцитарной активности нейтрофилов:

1. Фагоцитарный индекс - относительное количество фагоцитирующих нейтрофилов;
2. Фагоцитарное число - среднее количество частиц, поглощенных одним нейтрофилом;
3. Фагоцитарную емкость - абсолютное количество частиц, поглощенных нейтрофилами, содержащимися в 1 мкл крови.

Для оценки действия препаратов на иммунный статус в системе *in vitro* (на поверхностные рецепторы Т-лимфоциты) проводятся исследования на периферической гепаринизированной крови (гепарин 10 Ед/мл) человека и животных в количестве 2-3 мл, из которой выделяются лимфоциты на градиенте плотности фиккол-верографин (1,077 г/л). Выделенные лимфоциты отмывают средой Хэнкса и при содержании 2×10^5 кл/мкл и инкубируют с изучаемыми препаратами в концентрации 1 мкг/мл (по 50 мкл), при 37°C в течение 30 минут. После инкубации препараты удаляют центрифугированием и соединяют со 100 мкл 0,5% эритроцитов барана (ЭБ). После центрифугирования в течение 2 мин, инкубации при

4°C в течение 60 мин, фиксации глутаральдегидом и окраски по Дозморову-Задорожному проводят микроскопирование препаратов с подсчетом процента розеткообразующих лимфоцитов (РОЛ) (присоединивших 3 и более эритроцитов).

Определение токсических доз соединений. Исследования по определению острой токсичности исследуемых соединений проводили на мышцах-самцах линии BALB/c со средним весом 20-25 г в возрасте 2 месяца. На протяжении всего эксперимента животных содержали в условиях вивария на стандартном рационе.

Острая токсичность исследуемых веществ изучена на мышцах. Сначала определяли токсичность на небольшой группе животных с целью получения ориентировочных доз. Затем токсичность изучали уже на большой группе животных (по 6-8 животных на одну концентрацию вещества) с широким интервалом доз для получения процента летальных доз (ЛД), равных 16, 50 и 84%. Соединения готовили для введения в 2% этаноле в физиологическом растворе. Вещества животным вводили внутрибрюшинно и перорально в объеме 0,3 мл на мышшь весом 20 г. Вещества вводили однократно и наблюдали гибель животных в течение 30 суток.

Максимально переносимые дозы (МПД) при 10-кратном введении веществ определяли непосредственно на животных-опухоленосителях в ходе подбора оптимальных терапевтических доз. Определение острой токсичности осуществляли с помощью пробит- и регрессионного анализа [9,19].

Изучение показателей иммунного статуса - проводили в циркулирующей крови (гепарин 10 Ед/мл) экспериментальных животных в день забоя. Исследования проведены согласно методическим рекомендациям Института иммунологии РФ и Института Иммунологии АН РУз [13,18,20] и включало: определение общего количества лейкоцитов и их фенотипирования с помощью моноклональных антител

производства ИИ МЗ РФ: CD4, CD8, CD16, CD19 к поверхностным рецепторам субпопуляций иммунокомпетентных клеток: Т-хелперов/индукторов; Т-супрессоров/киллеров; натуральных киллеров (НК) и В-лимфоцитов соответственно. Фагоцитарную активность нейтрофилов определяли по способности их фагоцитировать нейтральные частицы латекса размером 1,5 мк. С помощью реакции торможения миграции лимфоцитов (РТМЛ) по микрокапиллярам определяли спонтанную миграцию лейкоцитов периферической крови (СМ ПК), в сыворотке крови определяли активность спонтанных цитокинов (СЦ), влияющих на миграцию лимфоцитов периферической крови (ЛПК) (сФУМ и СФСМ) активность Т-лимфоцитов по КонА-индуцированной продукции фактора угнетающего и фактора стимулирующего миграцию лейкоцитов (ФУМ-л и ФСМ-л).

Изучение влияния К-42 и К-48 на состояние костного мозга и периферической крови, индукцию СКК после лучевого воздействия у экспериментальных животных.

Опыты проведены на беспородных мышах-самцах, которых облучали на радиотерапевтической установке в дозе 8-8,5 Гр, мощность дозы 1,1 Гр.мин. Вещества вводились до облучения, однократно в дозах 1 мг/кг внутрибрюшинно, а также в терапевтической дозе (К-42 -12 мг/кг, К-48 - 100мг/кг). Животных забивали на 9-й день после облучения под эфирным наркозом, с последующим забором крови, окрашиванием для определения содержания лейкоцитов в мазках, а также забором костного мозга и изучения его клеточности, выделения селезенки для определения количества эндогенных колоний (КОЕ-с).

Для выяснения влияния новых веществ К-42 и К-48 на дифференцировку СКК был проведен эксперимент на беспородных мышах.

Изучение воздействия новых производных на колониобразующие единицы в селезенке с определением ростков стволовых кроветворных клеток.

Для выяснения влияния новых веществ К-42 и К-48 на дифференцировку СКК был проведен эксперимент на беспородных мышах. Испытуемые вещества (К-48 и К-42) вводились через 2 часа после облучения в дозе 1 мг/кг перорально, кроме того, изучали действие К-48, в дозе 100 мг/кг, введенную внутривентриально, а также колхицин в дозе 0,02, введенный перорально. Эта доза, при которой эти вещества проявляют иммуномодулирующую активность. На 9-е сутки после облучения животных забивали под эфирным наркозом. Для определения ростка СКК проводили морфологические исследования селезенок, а также периферической крови по общепринятым методикам. Колонии в селезенке подсчитывали через 24 часа после фиксации в растворе Буэна.

При определении величин токсических доз использовали метод пробит- и регрессионного анализа (49). Для этого находили долю погибших животных (Р), как отношение числа погибших животных к первоначальному числу животных в группе, и по таблице находили пробиты значения Р (у).

Затем решали систему нормальных уравнений:

$$b_{y/x} = \frac{\sum_{i=1}^n x_i y_i - n \bar{x} \bar{y}}{\sum_{i=1}^n x_i^2 - n \bar{x}^2};$$

$a = \bar{y} - b_{y/x} \bar{x}$; где n - число доз вещества;

$x = \lg \text{Дозы} (\lg \text{Д});$

y - пробиты значения Р.

После этого находили последовательно значения регрессии пробитов (yx), используя уравнение линейной зависимости:

$yx = bx + a$, где $x = \lg \text{Д}$ каждого значения ряда.

Для нахождения значений ЛД₁₆, ЛД₅₀ и ЛД₈₄, строили пробитные графики эффекта доз. На оси абсцисс откладывали lgД, а на оси ординат - значения регрессии пробитов.

При математической обработке результатов по оценке противоопухолевой активности соединений использовали формулу Стьюдента-Фишера, в модификации Ш.Д.Мошковского (48) применительно к химиотерапевтическим опытам:

$$t = \frac{(x - x_1) \cdot \sqrt{\frac{n \cdot n_1 (n + n_1 - 2)}{(n + n_1) \cdot \sum (x - \bar{x})^2 + \sum (x_1 - \bar{x}_1)^2}}}{\sqrt{\frac{n \cdot n_1 (n + n_1 - 2)}{(n + n_1) \cdot \sum (x - \bar{x})^2 + \sum (x_1 - \bar{x}_1)^2}}}$$

где n - число животных в контрольной группе; n₁ - число животных в подопытной группе; \bar{x} - средний вес опухоли в контроле; x - абсолютный вес опухоли у каждого животного (всех вариантов ряда) в контроле; x₁ - средний вес опухоли в опыте; x₁ - абсолютный вес опухоли у каждого животного (всех вариантов ряда) в опыте; $\sum (x - \bar{x})^2$ - сумма квадратов разности отклонений от средней величины опухоли в контроле;

$\sum (x_1 - \bar{x}_1)^2$ - сумма квадратов разности отклонений от средней величины опухоли в опыте;

(n + n₁ - 2) - носит название "степеней свободы".

На основании вычисленной величины t и числа "степеней свободы" по таблице Стьюдента находили критерий 1 - P (достоверность разницы между подопытной и контрольной группой). Опыт считался достоверным, если 1 - P > 0,950 или P < 0,05.

Математическую обработку остальных экспериментальных результатов, осуществляли по Лакину Г.Ф., 1973 (29). Для этого вначале находили среднюю арифметическую (\bar{x}) из ряда опытных и контрольных групп по формуле:

$$\bar{x} = \frac{x_1 + x_2 + x_3 + \dots + x_n}{n}, \text{ где } n - \text{число значений ряда.}$$

При этом \bar{x} являлась генеральной средней (M) для каждой группы. Среднеквадратическое отклонение от суммы значений ряда (δ) находили по формуле:

$$\delta = \sqrt{\frac{(x_1 - \bar{x})^2 + (x_2 - \bar{x})^2 + \dots + (x_n - \bar{x})^2}{n}}$$

где, $(x_1 - \bar{x})^2$ квадрат разности каждого отдельного значения ряда и средней арифметической.

Процент среднеквадратического отклонения опытных групп к контролю вычисляли по формуле:

$$\% = \frac{\delta_{\text{опыт}}}{\delta_{\text{контроль}}} \times 100$$

Выборочную ошибку средней (m) рассчитывали по формуле:

$$m = \delta / \sqrt{n};$$

Далее находили t - распределение Стьюдента (t), пользуясь формулой:

$$t = \frac{M_1 - M_2}{\sqrt{m_1^2 + m_2^2}};$$

где $M_1 - M_2$ - разница генеральных средних опытной и контрольной групп; $m_1^2 + m_2^2$ - сумма выборочных средних ошибок опытной и контрольных групп.

Фактическое значение критерия Стьюдента (t_{ϕ}) вычисляли по формуле:

$$t_{\phi} = \frac{X_{\text{опыт}} - X_{\text{контроль}}}{m}$$

Число "степеней свободы" (k) находили по формуле:

$$k = (n_{\text{контроль}} + n_{\text{опыт}} - 2).$$

На основании вычисленной величины t_{ϕ} и числа степеней свободы, находили по таблице критериев Стьюдента (t_{st}) при уровне значимости (P), равном 0,05. При $t_{\phi} > t_{st}$ нулевая гипотеза отвергалась и разница признавалась статистически достоверной (48,49,29).

Математическую обработку экспериментальных данных осуществляли по методу Стьюдента-Фишера, применительно к биологическим исследованиям. Достоверными считали различия на уровне значимости $P < 0,05$.

ГЛАВА III. РЕЗУЛЬТАТЫ ПРОВЕДЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ ПО ИЗУЧЕНИЮ МЕХАНИЗМОВ ДЕЙСТВИЯ НОВЫХ ПРОИЗВОДНЫХ

3.1. Получение новых производных трополоновых алкалоидов

В лаборатории по разработке противоопухолевых препаратов РОНЦ получен большой ряд оригинальных веществ на основе митозтормозящих алкалоидов колхицина и колхамина (10) к настоящему времени из 50 новых синтезированных веществ выделено 4 активных соединения: К-42, К-48, К-60 и К-20 (колхиприт), которые обладают меньшей токсичностью и высокой противоопухолевой активностью, обусловленная сочетанием антимитотического (тубулининтерактивного) и алкилирующего механизмов действия. Исследованы и изучены их токсические свойства и противоопухолевая активность на большом количестве опухолевых штаммов, изучена острая и хроническая токсичность для возможности их дальнейшего клинического использования, подтвержденными независимыми исследованиями в Национальном институте рака (NCI) США.

Изыскание новых противоопухолевых препаратов с улучшенными параметрами действия, чем существующие, остается одним из ведущих направлений в создании более совершенных методов лечения злокачественных новообразований. Клиническая онкология располагает большим рядом эффективных препаратов. Однако их выраженный общетоксический эффект, быстро развивающаяся резистентность организма к ним, а также разнообразие форм онкологических заболеваний диктует необходимость расширения арсенала действующих препаратов. В этой связи появление в последнее десятилетие таких препаратов с антимитотическим действием как таксаны, новые производные алкалоидов винка и лактона подофиллотоксина показали новые перспективы в лечении запущенных стадий рака.

На перевивных опухолях животных показана высокая противоопухолевая активность малотоксичного соединения, названного К-48, отобранного в предварительных экспериментах, активность которого превышает как активных исходных колхицина и применяемого в онкологии колхамина на 20-70%, а также других противоопухолевых препаратов, в частности циклофосфана. Значительным показателем при лечении животных является также процент рассосавшихся опухолей при его воздействии. При этом изучение иммуномодулирующего действия препарата после проведенного им лечения показало, что К-48, наряду с высокой противоопухолевой активностью, проявил способность значительно повышать количество антителообразующих клеток (АОК) после проведенного лечения. Ранее было показано, что стимуляция АОК этим препаратом особенно выражена при применении дозы 1 мг/кг, причем оказалось, что эта доза обладает и противоопухолевым эффектом. Цитогенетические исследования этого препарата в терапевтических дозах показали отсутствие мутагенных свойств в отношении клеток костного мозга. Эти исследования позволили сделать вывод о получении противоопухолевого препарата с отсутствием иммуносупрессивных свойств и не имеющего негативного влияния на костный мозг. При этом обнаружение у ряда новых веществ, и в наибольшей степени у К-48, способности к выраженной индукции стволовых клеток, позволило сделать предположение о том, что это соединение не только не ингибирует клетки костного мозга, но и продуцирует их к интенсивному размножению, которое ведет к последующему образованию иммуно- и гемопоэтических клеток. Поэтому важным является изучение механизма его иммуномодулирующего действия и способности влиять на систему гемопоэза, т.е. выяснить его непосредственное воздействие в организме на системном уровне. Не исключалось, что первичным звеном, запускающим процесс усиленного колониеобразования (КОЕс) является образование ИЛ-3.

Таким образом, необходимо изучить механизм действия данного соединения, часть из которых уже проведена. Нужно понять какой из механизмов: тубулининтерактивный или алкилирующий доминирует в противоопухолевом действии этого препарата. Как осуществляются увеличение иммуномодулирующей активности этим веществом, и как влияет способность к индукции образования колоний (КОЕс), на эти факторы, и не является ли последняя способность доминирующей в реализации основного механизма действия. Ответы на эти вопросы могут дать серию новых противоопухолевых препаратов как непосредственно для лечения опухолей, так и корригирующих гемо- и иммуногенез у онкологических больных после проведения специальной терапии.

Таким образом, целью настоящего исследования явилось изучение механизма действия новых отобранных соединений К-48 и К-42, которые в малых дозах проявляют более выраженную иммуномодулирующую активность при сохранении противоопухолевой.

В этой связи необходимо было наработать препараты в количествах, необходимых для проведения экспериментов.

Выделение колхицина из растения и наработка из него соединения К-48

1. 1. Выделение колхицина из растения

Из растения Мерендера Робуста, проэкстрагировано этанолом 35 кг сухого растения. Нами модифицировалась методика выделения колхициновых алкалоидов, приведенная в [10]. Был изменен растворитель, применяемый в [9] для извлечения суммы веществ из растения (метанол на этанол), диэтиловый эфир заменен на этилацетат на этапе освобождения от хлорофилла, использовали для подщелачивания не щелочь, а аммиак. Колхицин фармакопейный выделяли как перекристаллизацией, так и методом колоночной хроматографии.

МЕТОДИКА ВЫДЕЛЕНИЯ КОЛХИЦИНА ИЗ РАСТЕНИЯ

MERENDERA ROBUSTA

1. Измельченное воздушно-сухое растение 5-6 раз экстрагировали этанолом. Каждую порцию экстракта проверяли для определения полноты выделения методом ТСХ в системе I и II. Растворитель отгоняли и затем этанольные экстракты объединяли.
2. Сумму экстрактов разбавляли водой, нерастворимые в воде смолистые вещества отфильтровывали, промывали водой, затем 2%-ным раствором соляной кислоты. Водный фильтрат подкисляли разбавленной (1:1) соляной кислотой.
3. Кислый маточный раствор экстрагировали эфиром или этилацетатом.
4. Промытый кислый маточный раствор экстрагировали хлороформом, при этом в хлороформ переходят алкалоиды нейтрального характера, в том числе колхицин.
5. Стуженный хлороформный экстракт промывали 3% раствором аммиака для удаления алкалоидов фенольного характера.
6. После щелочной обработки экстракт промывали водой до нейтральной среды промывных вод, высушивали сульфатом натрия и концентрировали.
7. Технический колхицин выделяли осаждением этилацетатом.
8. Далее колхицин очищали или хроматографически (колонка с окисью алюминия, элюент - хлороформ) или 3-4-кратной перекристаллизацией из этилацетата.

Выделение колхамин. После извлечения колхицина кислый маточный раствор (позиция 4 в способе получения колхицина) подщелачивали аммиаком до pH 8 и вновь подвергали экстракции хлороформом. В хлороформ переходили алкалоиды основного характера, в том числе колхамин. Стуженный хлороформный экстракт сушили над сернокислым натрием. Стуженный хлороформный экстракт промывали 3% раствором NaOH или, лучше, 3% раствором аммиака для удаления

алкалоидов фенольного характера. После щелочной обработки экстракт промывали водой до нейтральной среды промывных вод, высушивали сульфатом натрия и концентрировали. Технический колхамин выделяли осаждением этилацетатом. Далее колхамин очищали до фармакопейного методом колоночной хроматографии (колонка с окисью алюминия, элюент – хлороформ, а затем системы хлороформ-спирт в соотношениях 10:1, 10:2, 10:5).

1. Нарботка из колхицина К-48 для исследовательских целей

Синтез К-48 - нового соединения состоит из 5 стадий. Для описания опытов количества взятых веществ пересчитаны на 1 грамм исходных соединений.

Синтез колхицин-диэтанолamina (I)

К 1г. колхицина в 10 мл спирта добавили 1,9 мл диэтанолamina и перемешивали при 70° С в течение 20 часов. К реакционной смеси прибавили 100 мл дистиллированной воды, затем экстрагировали хлороформом. Сгущенный хлороформный экстракт помещали в колонку с окисью алюминия, вещества элюировали хлороформом, а затем смесью хлороформа со спиртом (1:1). После удаления растворителя, аморфную массу выкристаллизовывали из сухого эфира, выделили с выходом 0,59 г (50%), т.пл. 178-180 °С (из эфира), Rf 0,25 (система II, ад.б.). Вещество I - кристаллическое лимонно-желтого цвета, хорошо растворимое в спиртах, хлороформе, ацетоне, плохо - в воде и эфире.

УФ-спектр (λ max): 205, 255, 355 нм.

ИК-спектр (cm^{-1}): 1670 - (СО трополона), 3270-3360(- NH +OH).

Масс-спектр (m/z в %): M⁺ 472(1), 455(13), 454(42), 424(87), 423(69), 411(17), 410(9), 395(26), 369(43), 368(91), 365(56), 338(100).

1. Получение хлоргидрата колхицин-диэтанолamina (II)

Навеску основания I в 1 г растворяли в абсолютном этаноле и добавляли раствор хлористого водорода в абсолютном этаноле до кислой

реакции. Образовавшуюся аморфную массу отделяли, промывали сухим эфиром до нейтральной реакции и закристаллизовавшуюся массу высушивали в приборе «пистолет» для вакуумной сушки. Выход II - 78% (0,84 г). II - гигроскопичные кристаллы красно-коричневого цвета, т.пл. 135-137 °С, $[\alpha]^{20}_D -293^0$ (с 0,077, этанол), хорошо растворимые в спиртах и в воде. Препарат соответствует литературным данным [2]

Выход II считая на исходный колхицин - 0,495 г

2. Дезацетилирование хлоргидрата колхицин-диэтанолamina (III)

1 г. вещества II (2×10^{-3} моль) растворяли в 11% соляной кислоте, затем нагревали на песчаной бане при 130-140 °С в колбе с обратным холодильником в течение 2 часов, после чего реакцию смесь разбавляли в 100 мл воды и экстрагировали хлороформом. Концентрированный хлороформный экстракт очищали на колонке с силикагелем, последовательно в системах хлороформ: этанол = 24:1, 10:1, 5:1 и этанолом. III кристаллизовали из сухого эфира и получили 0,64 г (70%). Вещество III - мелкокристаллическое вещество желто-зеленого цвета, хорошо растворимое в спиртах, хлороформе, ацетоне, умеренно - в воде и эфире.

УФ-спектр (λ_{max}): 210, 244, 350, 400 нм.

ИК-спектр (cm^{-1}): 3270-3360- $NH_2 + OH$, 1670 -CO трополона.

ПМР-спектр (м.д.): 2,5+1,5 (4H, 2ш.с., -2H-5+2H-6); 3,61, 3,85, 3,87 (9H, 3с, 3хОСН 43 0), 2,5 (4H, ш.м.-N-СН 42 0); 3,7 (4H, м, СН 42 0-ОН) 4,0 4,70 (1H, м, H-7); 4,1 (2H, т, NH 42 0) 6,5 (1H, с, H-4), 6,7 (1H, д, J=29, H-12), 7,35 (1H, д, J=29, H-11), 7,46 (1H, с, H-8)

Масс-спектр (m/z в %): M^+ 430(100), 412(36), 382(70), 381(90), 353(12), 327(29), 326(40), 323(58), 322(12).

Выход III считая на исходный колхицин - 0,293 г

3. Алкилирование полученного производного этанолхлоргидрином (IV)

1 г. III растворили в 5 мл метанола, добавили 2 мл этанолхлоргидрина. и нагревали на водяной бане в течение 7 часов.

Отгоняли метанол, и вещества разделяли в колонке с окисью алюминия, которую сначала промывали смесью эфира с ацетоном (1:1), затем хлороформом, а затем последовательно смесью хлороформа с спиртом в соотношениях 20:1; 10:1. Выделили 0,21 г (19%) моноэтанольное производное с $R_f 0,46$ (ад.в. система II) и 0,37 г (31%) IV с $R_f 0,36$ (ад.в. система II). Оба вещества - желтовато-коричневые трудно кристаллизуемые вещества, очень гигроскопичные, хорошо растворимые в спиртах, хлороформе, ацетоне, частично - в воде и эфире. Вещество IV с т.пл. 140-142⁰ (из эфира).

УФ-спектр (λ max, нм, этанол): 215, 245, 265, 360.

ИК-спектр (см^{-1}): 3747-3653-ОН, 3386-3327 - ОН, 2932-СН-, 1598 - СО-трополон.

ПМР-спектр (м.д.): 2,4+1,8 (4Н, 2 ш.с, -2Н-5+2Н-6); 3,5, 3,85, 3,87 (9Н, 3с, 3хОСН₃),

2,7(8Н, ш.м. N-СН₂), 3,7 (8Н, ш.м, СН₂ -ОН), 6,5(1Н, с, Н-4)

Выход IV считая на исходный колхицин-0,109г

4. Хлорирование полученного производного (V)

К 1г IV в 5 мл сухого хлороформа при перемешивании в течение 30 минут добавляли по каплям 4 мл хлористого тионила. В течение 1 часа перемешивали без нагревания, и - 7 часов при 50-60⁰. Реакционную массу выливали в воду и экстрагировали хлороформом, затем V очищали на колонке с окисью алюминия, сначала элюируя хлороформом, затем последовательно смесью хлороформа со спиртом в соотношениях 10:1; 5:1; 2:1. Вещество с $R_f 0,56$ (ад.силуфол, система III) получили с выходом 60% (0,72г). К-45 - коричневый порошок с т.пл. 143-148⁰ (из эфира), хорошо растворимый в спиртах, хлороформе, ацетоне, плохо - в воде, этилацетате, эфире.

УФ-спектр (λ max, нм): - 210, 265.

ИК-спектр (см^{-1}): слабый - 3360 -NH, 2938-СН₃, СН₂ СН, 1699 - С=NH, 1588 - СО-трополон, 666 - Cl.

Препарат соответствует литературным данным [18]

Выход V считая на исходный колхицин-0,078г

Таким образом, из 1 г колхицина удается получить 0,078г К-48. Соединение получали по мере наработки колхицина, в сумме из 10 грамм колхицина поэтапно получено - 0,78 г препарата, который использован для проведения биологических исследований.

Получение колхиприта (К-20).

а) Получение К-17. К 1 г колхицина в 10 мл спирта добавили 1,9 мл диэтанолamina и перемешивали при 70 °С в течение 20 часов. Реакционный раствор растворяли в 100 мл воды и экстрагировали хлороформом. Сгущенный хлороформный экстракт помещали в колонку с окисью алюминия и вещества элюировали хлороформом, а затем смесью хлороформа со спиртом (1:1). После удаления растворителя, аморфную массу кристаллизовали из сухого эфира, выделили с выходом 39%, т.пл. 178-180° (из эфира), Rf 0,25 (система II, ад.б.). К-17 – кристаллы лимонно-желтого цвета, хорошо растворимые в спиртах, хлороформе, ацетоне, плохо – в воде и эфире.

б) Получение хлоргидрата К-17 К-17 помещают в колбу и прибавляют 250 мл. ацетона, далее, в колбу пропускают газообразный хлористый водород, из раствора выпадает смолообразный осадок гидрохлорида колхицина диэтанолamina. Выпавший осадок отделяют фильтрованием. Осадок промывается сухим диэтиловым эфиром. Хлоргидрат К-17 - гигроскопичные кристаллы красно-коричневого цвета, т.пл. 135-137 °С, хорошо растворимые в спиртах и в воде.

Получение хлоргидрата К-20. К 1г К-17 ХГ в 5 мл сухого хлороформа при перемешивании в течение 30 минут добавляли по каплям 7 мл хлористого тионила. В течение 1 часа перемешивали без нагревания, и – 7 часов при 50-60 °С. Отогнав избыток хлористого тионила, реакционную смесь разделяли на колонке с окисью алюминия. Основной продукт реакции (К-20) с Rf 0,18 (силуфол, система хлороформ-метанол

24:1) выделили в количестве 0,5 г (46%). Соединение К-20 - порошок желто-коричневого цвета с т.пл. 140° С (с возгонкой и разложением).

Получение К-42

Получение К-41 из К-14.

К 1г К-14 в 5 мл метанола добавили 7,5мл 22% раствора окиси этилена в метаноле и при охлаждении льдом перемешивали 3 часа, затем еще 3 часа - при комнатной температуре. Отогнали метанол, остаток 2 раза заливали хлороформом, который затем отгоняли, чтобы избавиться от метанола, после чего остаток заливали эфиром. Вещество закристаллизовалось, его измельчали и сушили. Выход К-41 1,01г (97%), т.пл. 68-720С (из эфира), Rf 0,22(система I, ад.б.), 0,64 (система II, ад.а.). К-41-кристаллическое вещество ярко-желтого цвета, хорошо растворимо в спиртах, хлороформе, ацетоне, частично - в воде и эфире.

6. Получение К-42 из К-41.

К 1г К-41 в 2,5 мл сухого хлороформа при перемешивании в течение 30 минут добавляют по каплям 3 мл хлористого тионила. В течение 3 часов перемешивали без нагревания, и - 7 часов при 50-600С, затем отгоняем растворитель и хлористый тионил. К остатку трижды добавляли хлороформ и отгоняют, затем К-42 очищали на колонке с окисью алюминия, сначала элюируя хлороформом, затем последовательно смесью хлороформа с метанолом в соотношениях 10:1; 5:1. Вещество с Rf 0,36 (силуфол, система хлороформ-метанол 24:1) осаждали из сконцентрированных хлороформных растворов сухим эфиром. Выход 65% (0,75г).

К-42 - светло-коричневый порошок с т.пл. 1820С (из эфира), хорошо растворимый в спиртах, хлороформе, ацетоне, плохо - в воде, этилацетате, эфире.

3.2. Определение способности к колониобразованию КОЕс исследуемыми соединениями в разных концентрациях и способах введения

Концентрация стволовых клеток в кроветворных органах сравнительно невелика - в костном мозге мышей их около 0,5%. Дифференцировка исходной полипотентной стволовой клетки, в морфологически распознаваемые клетки того или иного ряда, представляет собой многостадийный процесс, ведущий к значительному расширению численности каждого из рядов.

В данном эксперименте изучалась возможность стимуляции после лучевого воздействия КОЕс.

КОЕс (CFU-S) (Колониобразующая единица в селезенке) - Стволовые клетки способны восстанавливать кроветворение у облученных животных (радиозащитное действие), длительно поддерживать кроветворение и образовывать колониобразующие единицы селезенки (двенадцатидневные селезеночные колонии), дающие начало гранулоцитарным, моноцитарным, эритроидным, мегакариоцитарным и лимфоидным колониям [<http://humbio.ru/humbio/physiology/>].

Существование гемопоэтических стволовых клеток и их полипотентность доказана оригинальными научными исследованиями:

- показано, что костномозговые клетки, введенные летально облученным мышам, мигрируют в селезенку и там пролиферируют, образуя колонии. Эти колонии, образованные из одной стволовой клетки (колониобразующая единица селезенки - КОЕс), могут быть представлены любым типом клеток – эритроидными, гранулоцитарными, мегакариоцитарными или смешанными;
- при облучении колониобразующей клетки, возникающая в ней хромосомная перестройка, обнаруживается впоследствии во всех линиях кроветворных клеток (эритроцитах, гранулоцитах, макрофагах, мегакариоцитах, лимфоцитах) [14].

Как отмечено выше, огромный интерес представляло выяснение влияния К-48 на состояние костного мозга и периферической крови после лучевого воздействия.

С этой целью проведены опыты на беспородных мышах-самцах, полученных из вивария. Мышей облучали на радиотерапевтической установке гамма-лучами Со-60 в дозе 8-8,5 Гр, мощность дозы 1,1 Гр.мин. К-48 вводился до облучения вводили однократно в дозах 1 мг/кг и 100мг/кг внутрибрюшинно, а также в дозе 1 мг/кг перорально.

Животных забивали на 9-й день после облучения под эфирным наркозом. У животных проводился забор крови, с последующим его окрашиванием для определения содержания лейкоцитов в мазках, с выделением селезенки для определения количества эндогенных колоний (КОЕ-с).

3.3. Отбор соединений из 4-х К-48, К-42, К-20 и К-60 по наиболее значительной способности к колониеобразованию КОЕс в разных дозах.

Введение препаратов интакным животным проводили 1-кратно внутрибрюшинно после облучения в дозе 6Гр. Забой проводили на 9 день. В эксперименте мыши были разделены на группы:

1 группа - интакные животные (контроль 1)

2 группа - животные, которых облучали в дозе 6Гр

Всем подопытным животным (беспородные мыши), получившим облучение в дозе 6Гр через час после облучения, ввели препараты однократно в дозах 1 мг/кг и терапевтической дозе:

3 группа - К-20 в дозе 1 мг/кг

4 группа - К-20 в дозе 4 мг/кг

5-группа - К-48 дозе 1 мг/кг

6-группа - К-48 дозе 100 мг/кг

7-группа - К-42 дозе 1 мг/кг

8-группа - К-42 дозе 12 мг/кг

9 группа - К-61 в дозе 1 мг/кг

10 группа - К-61 в дозе 20 мг/кг

Для изучения влияния препаратов на КОЕс в дозе 1 мг/кг перорально, подопытных животных (беспородные мыши) облучали, через 1 час после облучения в дозе 6Гр вводили препараты. У забитых мышей определяли массу животных, селезенки, тимуса и количество КОЕс. Наиболее значительной способностью к колониеобразованию (КОЕс) обладали препараты К-48 и К-42.

Исследование КОЕс на беспородных мышях облучили 20/4, забой ч/з 10 дней

1-группа. Интактная группа

Таблица 1

№	масса животных до облучения (г)	масса животных через 9 дней (г)	масса селезенки (мг)	количество КОЕс	масса тимуса (мг)
1	19	22	80	1	29
2	20	22	92	2	42
3	24	26	70	3	54
4	22	24	70	2	35
Среднее	21,3	23,5	78	2	40

2 – группа. Облучение (контроль)

Таблица 2

№	масса животных до облучения (г)	масса животных через 9 дней (г)	масса селезенки (мг)	количество КОЕс	масса тимуса (мг)
1	20	19	55	5	20
2	23	24	21	3	30
3	20	19	60	3	15
4	19	18	45	5	20
5	20	16	55	4	15
Среднее	20,4	19,2	47,2	4	20

3 – группа. К-48 (1мг/кг)

Таблица 3

№	масса животных до облучения (г)	масса животных через 9 дней (г)	масса селезенки (мг)	количество КОЕс	масса тимуса (мг)
1	15	20	65	60	21
2	18	21	130	30	25
3	23	27	190	60	85
4	21	25	170	30	45
Среднее	19,5	23,25	138,75	45	44

4 – группа. К-48 (100мг/кг)

Таблица 4

№	масса животных до облучения (г)	масса животных через 9 дней (г)	масса селезенки (мг)	количество КОЕс	масса тимуса (мг)
1	21	20	90	60	24
2	15	17	200	30	45
3	22	26	90	20	35
4	22	29	38	45	30
Среднее	20	23	104,5	38,75	33,5

5 – группа. К-42 (1мг/кг) внутрибрюшинно

Таблица 5

№	масса животных до облучения (г)	масса животных через 9 дней (г)	масса селезенки (мг)	количество КОЕс	масса тимуса (мг)
1	16	20	65	5	35
2	23	24	100	13	24
3	18	22	105	15	40
4	24	25	150	16	27
Среднее	20,25	22,75	105	12,25	31,5

6 – группа. К-42 (12мг/кг) внутрибрюшинно

Таблица 6

№	масса животных до облучения (г)	масса животных через 9 дней (г)	масса селезенки (мг)	количество КОЕс	масса тимуса (мг)
1	26	22	80	19	25
2	15	22	105	39	30
3	22	20	135	34	50
4	20	19	135	26	40
Среднее	20,75	20,75	113,75	29,5	33,75

7 – группа. К-20 (1мг/кг)

Таблица 7

№	масса животных до облучения (г)	масса животных через 9 дней (г)	масса селезенки (мг)	количество КОЕс	масса тимуса (мг)
1	26	22	135	30	26
2	21	22	290	20	40
3	20	22	150	21	23
4	18	20	140	30	35
Среднее	21,25	21,5	178,75	25,25	31

8 – группа. К-20 (4 мг/кг)

Таблица 8

№	масса животных до облучения (г)	масса животных через 9 дней (г)	масса селезенки (мг)	количество КОЕс	масса тимуса (мг)
1	20	22	120	22	20
2	18	20	100	18	40
3	19	23	95	15	33
4	20	25	115	23	35
Среднее	19	21	107,5	19,5	33

9 – группа. К-61 (1 мг/кг)

Таблица 9

№	масса животных до облучения (г)	масса животных через 9 дней (г)	масса селезенки (мг)	количество КОЕс	масса тимуса (мг)
1	17	16	95	30	25
2	26	28	175	38	50
3	18	22	120	30	35
4	22	24	170	38	40
Среднее	20,75	22,5	140	34	37,5

10 – группа. К-61 (20 мг/кг)

Таблица 10

№	масса животных до облучения (г)	масса животных через 9 дней (г)	масса селезенки (мг)	количество КОЕс	масса тимуса (мг)
1	20	28	125	20	45
2	15	18	80	12	40
3	16	24	120	16	21
4	18	24	125	18	16
Среднее	17,25	23,5	112,5	16,5	30,5

Подопытных животных (беспородные мыши) облучали 20/4, через 1 час после облучения вводили препараты в 2-х дозах. Мышей забивали 29/4 2017г, определяли массу животных до облучения, во время забоя и массы селезенки, тимуса и количество КОЕс.

Влияние препаратов на КОЕс и изменения со стороны органов иммунной системы облученных животных (мыши)
при внутрибрюшинном введении

Таблица 11.

Группы	изменение массы тела животных за 9 дней (г)	масса селезенки (мг)	Абс.. число КОЕс	% КОЕс по отношению к интактной группе	% КОЕс по отношению к контрольной 1	масса тимуса (мг)	% изменения массы тимуса по отношению к контролю 1
Интактная	+2,2	78,0	2	0	-50,0	40,0	-
Облучение (контроль 1)	-1,2	47,2	4	200,0	0,0	20,0	-
К-20 (1 мг/кг)	0	107,5	25	1665,0	5325,0	31,0	55,0
К-20 (4 мг/кг)	+2	107,5	19	875,0	388,0	33,0	65,0
К-48 (1 мг/кг)	+4,75	138,7	45	2150,0	1025,0	44,0	120,0
К-48 (100 мг/кг)	+2	104,5	39	1837,5	868,7	33,5	57,5
К-42 (1мг/кг)	+1,5	97,5	12	512,5	206,2	31,5	95,0
К-42 (12мг/кг)	0	90,0	29	1375	537,5	33,7	68,7
К-61 (1 мг/кг)	+1,75	140,0	34	1600,0	750,0	37,5	87,5
К-61 (20 мг/кг)	+6,25	86,3	8	325,0	112,5	30,5	52,5

*P < 0,01 – по отношению к интактной группе;

** P < 0,01 – по отношению к контролю

Сравнительный анализ исследуемых показателей селезенки и тимуса, показал, что масса селезенки под воздействием облучения уменьшается на 39% по отношению к интактной группе ($P > 0,01$). Применение К-48 в 2-х дозах способствует увеличению массы селезенки по отношению как к интактному, так и к контролю 1 (облучение), наблюдается значительное увеличение этого показателя. При воздействии К-48, масса тимуса увеличивается на 120% по отношению к контролю (облучению), но от 25 на 10 % больше массы тимуса интактных животных. Как видно из таблицы 1, масса тимуса интактных животных на 100% больше массы тимуса облученных мышей.

Величина КОЕс при применении К-48 в дозе 1 мг/кг в 11,25 раз больше, чем в контрольной группе (облучение), что говорит о позитивных возможностях препарата влиять на кроветворение. В терапевтической дозе-100 мг/кг К-48 также вызывает увеличение КОЕс в 9,7 раз.

Применение К-42 в дозе 1мг/кг способствует увеличению массы селезенки и массы тела по отношению к контролю 1 (облучение) и к интактному контролю - в дозе 12мг/кг К-42 не наблюдается снижения этих показателей (масса тела и селезенки). При воздействии К-42 масса тимуса увеличивается от 69 до 95% по отношению к контролю (облучению), но на 21-25 % меньше массы тимуса интактных животных.

Величина КОЕс при применении К-42 в дозе 1 мг/кг в 3,2 больше, чем в контрольной группе (облучение), в терапевтической дозе (12 мг/кг) К-42 также вызывает значимое увеличение КОЕс в 7,4 раза.

Применение К-20 в дозах 1 и 4 мг/кг не снижает массу селезенки по отношению как к контролю 1(облучение), так и к интактному контролю, не наблюдается снижения массы тела. При воздействии К-20 масса тимуса увеличивается до 55% по отношению к облучению, но на 22,5 % меньше массы тимуса интактных животных.

Величина КОЕс при применении К-20 в дозе 1 мг/кг в 6,3 больше, чем в контрольной группе (облучение), в терапевтической дозе-4 мг/кг К-20 также вызывает увеличение КОЕс в 4,8 раз.

При применении К-61 в дозах 1 и 20 мг/кг не наблюдается снижения массы тела, не снижается масса селезенки по отношению как к контролю 1 (облучение), так и к интактному контролю. При воздействии К-61 масса тела увеличивается на 1,75-6,25г по отношению к исходному весу. Масса тимуса увеличивается на 88-53% в сравнении с тимусом облученных животных, но на 6-24% меньше массы тимуса интактных животных. Однако величина КОЕс при применении К-61 в дозе 1 мг/кг в 8,5 больше, чем в контрольной группе (облучение), в терапевтической дозе К-61 также вызывает увеличение КОЕс в 7,6 раза.

Колхицин в известной литературе отнесен к радиомиметикам, веществам, сходным по действию с облучением. Следует отметить, что К-42, К-48, К-20 и К-61 являются в силу своих структурных особенностей (из-за введения алкилирующих фрагментов) являются более выраженными радиомиметиками, чем исходные алкалоиды и дэкоцин, и в большей мере усиливают выброс КОЕс, причем, К-48 даже в ТД. Это, вероятно, обуславливает и необычные для противоопухолевых препаратов иммуномодулирующие свойства, которые проявляются у всех 4-х препаратов и отсутствие мутагенности у К42 и К-48, и преодоления МЛУ. Видно, что при стимуляции КОЕс до 40ед у К-48 появляются свойства, не характерные для цитостатиков - отсутствие мутагенности и появление иммуномодулирующих свойств. Хотя К-42 вызывает меньшую стимуляцию КОЕс в 18-20 ед., чем К-48, однако у него также проявляются свойства не характерные для цитостатиков - отсутствие мутагенности, а иммуномодулирующие свойства обнаруживаются только при пероральном применении.

Воздействие исследуемых соединений на популяцию КОЕс можно объяснить не влиянием их на выход первичных радиационных поражений,

а изменением интенсивности процессов пострадиационного восстановления.

Наконец, важный вопрос, на котором необходимо остановиться при обсуждении возможного применения новых веществ К-48 и К-42 в терапии опухолей, – это выраженная гемопоэтическая, особенно К-48, в дозе 1 мг/кг активность этого вещества. Данная активность веществ обеспечивается его способностью индуцировать секрецию макрофагами гемостимулирующих цитокинов и, в частности, колониестимулирующих факторов и IL-1.

Экспериментально показано, что у животных с цитопенией, вызванной облучением или введением высоких доз цитостатических препаратов, при введении К-48 в дозе 1 мг/кг восстановление клеточного состава крови происходит быстрее, чем в контрольной группе

Вероятно, что природные алкалоиды, увеличивают выход колониеобразующих единиц в селезенке, способствуя их дифференцировке из незрелых предшественников. Наибольшей стимулирующей способностью на выход колониеобразующих единиц, обладает вещество К-48, причем в широком диапазоне концентраций. По-видимому, данные соединения являются индукторами колониестимулирующего фактора на одном из этапов дифференцировки стволовых клеток. Кроме того, возможно, что К-48, введенный, как и колхицин, за 48 часов до облучения может защищать организм от воздействия ионизирующей радиации, восстанавливая процессы первичных радиационных поражений и не вызывая общетоксических побочных эффектов, свойственных для колхицина. Помимо этого, К-48 может стать веществом, способным восстанавливать организм с угнетенным кроветворением после химио- и радиотерапии, причем его применение для этих целей возможно в минимальных дозах, не вызывающих токсических проявлений (1,0 мг/кг).

Сравнительная оценка влияния веществ на число КОЕс

Таблица 12

Вещество	Доза, мг/кг	Способ введения	Масса селезенки, мг	Абсолютное число КОЕс	% числа КОЕс к контролю
Колхицин	0,2	в/бр	127,7±7,63*	46±3,23	+1042,5
	0,5	в/бр	70,3±2,18*	15±0,60	+282,5
	1,0	в/бр	59,3±1,71	10±0,44	+157,5
Колхамин	1,0	в/бр	150,4±8,20	40±1,57	+910,0
	2,0	в/бр	141,6±6,00	15±0,51	+275,0*
	6,0	в/бр	116,5±4,32*	8±0,38*	+100,0*
К-48	1,0	в/бр	197,4±11,20	61±4,23	+1415,0
	100,0	в/бр	169,4±6,40	43±1,81*	+995,0*
	300,0	в/бр	149,4±5,12	15±0,21*	+280,0
	1,0	р/ос	111,0±5,3*	42±1,67*	+962,5*
Контроль (облуч.)			77,2±3,13*	4±0,18	

*P≤0.05

Ранее было показано, что новые производные колхицина и колхамина способны увеличивать численность КОЕс [10,16,17]. Нами в настоящем исследовании необходимо было подтвердить имеющиеся данные по действию препарата К-48, а также изучить его влияние на процесс стимуляции ростков СКК и их дифференцировки. Кроме того, было интересно сравнить действие К-48 с действием исходных алкалоидов, примененных также в различных концентрациях.

Теоретические предпосылки.

Гемопоз - процесс образования форменных элементов крови: эритроцитов (эритропоз), лейкоцитов (лейкопоз) и тромбоцитов (тромбоцитопоз).

У взрослых животных он совершается в красном костном мозге, где образуются эритроциты, все зернистые лейкоциты, моноциты, тромбоциты, В-лимфоциты и предшественники Т-лимфоцитов. В тимусе проходит дифференцировка Т-лимфоцитов, в селезенке и лимфатических узлах - дифференцировка В-лимфоцитов и размножение Т-лимфоцитов.

Общей родоначальной клеткой всех клеток крови является полипотентная стволовая клетка крови (ПСКК), которая способна к дифференцировке и может дать начало роста любым форменным элементам крови и способна к длительному самоподдержанию. Каждая стволовая кроветворная клетка при своем делении превращается в две дочерние клетки, одна из которых включается в процесс пролиферации, а вторая идет на продолжение класса полипотентных клеток. Дифференцировка стволовой кроветворной клетки происходит под влиянием гуморальных факторов. В результате развития и дифференцировки разные клетки приобретают морфологические и функциональные особенности.

Полипотентные стволовые гемопоэтические клетки (ПСГК) находятся в красном костном мозге и способны к самообновлению. Они могут также циркулировать в крови вне органов кроветворения. ПСГК костного мозга при обычной дифференциации дают начало всем типам зрелых клеток крови - эритроцитам, тромбоцитам, базофилам, эозинофилам, нейтрофилам, моноцитам, В- и Т-лимфоцитам.

В результате проведенного экспериментального изучения нами было обнаружено, что после воздействия летальной дозы облучения у интактных животных колониеобразующая способность повышается и в селезенке образуется от 2 до 7 колоний, в то время как у мышей, не подвергнутых облучению, было 2-3 колонии. К-48 оказался самым активным среди рассматриваемых соединений по стимулирующему воздействию на вес кроветворного органа и численность КОЕс. Уже в дозе 300 мг/кг, составляющей 1/3 от ЛД₅₀ К-48 практически вдвое увеличивал вес кроветворного органа и численность КОЕс до 15,2 единиц, в терапевтической дозе (100 мг/кг) количество КОЕс составляло 43,8 единиц (значение, близкое к сливному росту), в дозе 1 мг/кг этот показатель переходил в сливной рост колоний, при этом вес селезенки в 2,5 раза превосходил контрольный уровень. Влияние К-48, примененного в

дозе 1 мг/кг перорально схоже с его действием в дозе 100 мг/кг при внутрибрюшинном введении, однако с той разницей, что он не способствовал резкому увеличению массы селезенки, при этом следует учитывать, что эта доза является 1/10000 от его ЛД50.

Колхицин и колхамин оказались сходными по своему действию на численность КОЕс: даже в МПД количество колоний в 2-2,5 раза превышало контрольный уровень, однако колхицин значительно сильнее снижал массу селезенки. В терапевтической дозе при действии природных алкалоидов численность КОЕс составляла 15 абсолютных единиц, а в дозе 1/3 ЛД16 - 40 - 45 единиц с резким одновременным увеличением веса селезенки по сравнению с облученным контролем.

Таким образом, К-48 в разных дозах и способах введения после лучевого воздействия способствуют увеличению количества микро- и макроколоний (КОЕс) в 5-10 раз, что является одним из факторов, стимулирующих образование новых гемопоэтических и иммунокомпетентных клеток и тем самым, способствуя восстановлению показателей периферической крови.

При введении К-48 (табл.12) в дозе 1 мг/кг внутрибрюшинно наиболее значительно увеличивается количество эндогенных колоний, но и для других исследованных доз (1 мг/кг перорально, 100 мг/кг внутрибрюшинно) также наблюдается высокий уровень колониеобразования. Так, для дозы 1 мг/кг перорально количество колоний составляет 42,5 единиц, а для дозы 100 мг/кг, введенной внутрибрюшинно, – 43,8 единицы. Также следует отметить, что колхицин в дозе 0,02 мг/кг проявляет способность к увеличению КОЕс (12,8), что тоже является значимым результатом, так как увеличение КОЕс в 2 - 3 раза указывает на активность применяемых препаратов.

3.4. Изучение влияния К-48 на восстановление состояния периферической крови после лучевого воздействия

В контексте вышесказанного, нами было проведено изучение влияния К-48 на восстановление состояния периферической крови после лучевого воздействия. Изучение проводилось вышеописанным методом. После лучевого воздействия для определения влияния К-48 были изучены гематологические показатели крови.

Влияние К-48 на восстановление кроветворения после лучевого воздействия

Таблица 13

Группа	Селезенка	Периферическая кровь	
	КОЕ-с абс.ч.	Лейкоциты абс.ч.	Гранулоциты %, /абс.
Контроль (интактные)	1,8±0,01*	9018±4092*	21,2/1913± 615*
Контроль (облучение)	4,6±0,4*	2628±503*	1,06/29±0,32*
К-48 (в/бр) 1мг/кг	60,6±1,4*	9083±2505*	46,6/2113±701*
100мг/кг	43,8±0,8*	7046±2306	36,3/2016±603*
1мг/кг (р/ос)	42,5±0,6*	9010±2418	48,2/2312±723,0*

*P≤0.05

Как видно из полученных данных (таблица 13), применение лучевой терапии приводит к резкому угнетению в гемопоэтической системе: значительно уменьшается масса селезенки, (примерно в 5 раз по сравнению с интактным контролем). В контрольной группе с облучением по сравнению с опытной группами отмечается уменьшение популяции КОЕ-с и практически полное отсутствие гранулоцитов в периферической крови, и уменьшение количества лейкоцитов в 4 раза.

У животных в опытной группе с введением К-48 во всех использованных концентрациях полностью восстанавливается количество лейкоцитов в группах с применением препарата в дозе 1мг/кг.

Однако эта доза менее, чем 1 мг/кг способствует увеличению гранулоцитов, которые увеличиваются в 1,5 раза в сравнении с нормой, в то время как доза 1 мг/кг (введенная как перорально, так и внутрибрюшинно) увеличивает этот показатель более, чем в 2 раза.

Изученные свойства К-48 позволяют сделать вывод, что наряду с противоопухолевым эффектом, он в зависимости от дозы и способа введения оказывает выраженное гемостимулирующее действие: лечение этим препаратом облученных мышей (6 Гр) приводит к более полному и быстрому восстановлению пула КОЕ-с, получавших этот препарат в дозе 1 мг/кг внутрибрюшинно формируется большое число эндогенных колоний, в сравнении с контролем, что также способствует восстановлению состояния периферической крови после проведения лучевого воздействия.

Лечение мышей, получивших лучевое воздействие соединением К-48, способствовало стимуляции роста эндогенных колоний в селезенке. Способность К-48 стимулировать рост эндогенных колоний в селезенке, возможно, связана с его иммуномодулирующей активностью, так как стромальным элементом, как системы иммунитета, так и системы кроветворения служит ретикулярная клетка и образуемый ею ретикулярный синтиций. Функции ретикулярного синтиция в ходе развития иммунного ответа глубокие, о чем свидетельствует "метаболический взрыв", наблюдаемый в ретикулярной ткани на фоне развития как первичного, так и вторичного иммунного ответов. В результате этого рамки систем кроветворения и иммунитета практически совпадают и можно заключить, что иммуногенез - это лишь одна из функций кроветворной ткани, которая играет важную регуляторную роль в обеспечении иммуноструктурного и иммунохимического гомеостаза, в том числе и в обмене ксенобиотиков, включая антигены [15,16,18,19].

Таким образом, увеличение числа КОЕс, индуцируемое К-48 в 5-10 раз приводит к стимуляции образования новых гемопоэтических и, по-всей видимости, иммунокомпетентных клеток.

3.5. Изучение влияния К-48 клеточный состав селезенки (спленограмма) после лучевого воздействия

Изучение влияния соединений на численность эндогенных колониобразующих единиц в селезенке (КОЕс) проводили на 30 мышах линии BALB/c обоего пола, средней массой – 22 гр, которых облучали на аппарате «THERATRON» с мощностью 112 с Гр/мин, источник Со60 в субтотальной дозе равной 6 Гр на 7-е сутки после облучения [22].

Препарат К-48 вводили опытной группе через 2 часа после субтотального облучения однократно, в дозе 1 мг/кг внутрибрюшинно. Через 7 дней мышей забивали декапитацией и извлекали у них тимус, селезенку. Определяли массу селезенки и тимуса, производили подсчет количества макроколоний в селезенке.

Влияние К-48 на некоторые иммунологические показатели облученных животных (мышь)

Таблица 14

№	Группы	вес животного	вес селезенки	вес тимуса	КОЕс
1.	Интактная	22,1 \pm 2,0	69,5 \pm 5,0	40,0 \pm 3,5	3,6 \pm 3,0
2.	Облучение (контроль)	21,4 \pm 2,0	42,4 \pm 4,0*	20,0 \pm 2,0*	3,8 \pm 2,0*
3.	К-48 (1мг/кг) в/бр.	20,0 \pm 2,0*	47,0 \pm 3,8*	62,0 \pm 5,0	34,0 \pm 3,0

* P 0,01 – по отношению к интактной группе;

** P 0,01 – по отношению к контролю

Сравнительный анализ исследуемых параметров селезенки и тимуса (таблица 14), показал, что масса селезенки под воздействием облучения уменьшается на 38,2% по отношению к интактной группе (P>0,01). Применение К-48 способствует увеличению массы селезенки на 11% по отношению к контролю (облучение). Количество колоний при облучении почти не отличалось от интактной группы мышей. Под действием препарата К-48, число колоний достоверно увеличивалось на 944%, по

отношению к интактной группе, и на 895% по отношению к контролю ($P>0,001$).

При облучении масса тимуса уменьшилась в 2 раза по отношению к интактной группе, а после лечения К-48 увеличилась на 310% по отношению к контролю ($P>0,001$).

В периферической крови нет существенной разницы в числе эритроцитов между контролем (облучение) и опытной группой (К-48). Это объясняется большой продолжительностью жизни эритроцитов.

У облученных мышей, леченных К-48, картина мегакариоцитогаммы была существенно отличима: полихроматофильных форм мегакариоцитов оставалось больше, чем в контрольной группе (облучение), так в опыте их число составляло $53,0+5,5\%$, а в контроле – $26,3+3,0\%$ ($P>0,01$).

Таким образом, однократное внутрибрюшинное введение препарата К-48 в дозе 1 мг/кг (внутрибрюшинно) способствовало уменьшению повреждающего действия при проведении облучения.

3.6. Изучение влияния К-48 на периферическую кровь у животных-опухоленосителей с перевивным штаммом Саркома - 180

На штамме Саркомы-180, перевитом на мышей, лечение начато через 48 часов после перевивки опухоли. В экспериментах исследовался К-48 при внутрибрюшинном и пероральном способах введения в дозах 100 и 1 мг/кг. Через 7 дней после последнего введения веществ животных забивали. После забоя проводили забор периферической крови для изучения гематологических показателей.

В данном эксперименте К-48 в дозе 100 мг/кг при внутрибрюшинном введении проявил значительный росттормозящий эффект для данного опухолевого штамма в 56,2% (ИЭ - 2,28); а примененный в дозе 1 мг/кг перорально, тормозил на 50,0% рост опухоли (ИЭ – 2,0), что значительно не отличалось от действия терапевтической дозы, примененной внутрибрюшинно. Таким образом, как видно из полученных данных,

учитывая злокачественность данного вида опухоли, а также то, что на современном этапе не существует достаточно эффективных средств для ее лечения, необходимо отметить, что препараты показали выраженный росттормозящий эффект, сохраняя также при этом массу селезенки и тела животных-опухоленосителей.

При изучении гематологических показателей, полученных в данном эксперименте, обнаружено гемостимулирующее действие препаратов. Необходимо отметить, что вещество, примененное в этих дозах (как перорально, так и внутривнутрибрюшинно), хотя и не проявило значимого противоопухолевого эффекта, но, обладая способностью модулировать иммуногенез, оказало положительное воздействие на гематологические показатели у животных-опухоленосителей, нормализуя общий анализ крови у экспериментальных животных.

Так, в группе при введении К-48 в дозе 1 мг/кг Нб по отношению к интактному контролю (90-100 г/л) нормализовался до 90 г/л; при введении препарата в дозе 100 мг/кг внутривнутрибрюшинно – до 70 г/л. Также по отношению к контролю восстанавливались и другие гематологические показатели (таблица 15).

Гематологические показатели экспериментальных животных с перевивным штаммом Саркомы-180 после воздействия К-48

Таблица 15

Показатели крови	К-48			
	100мг/кг, в/б	1мг/кг, р/о	контроль	норма
Гемоглобин, (г/л)	70±3,2*	90±3,9*	42±1,9	100-112
Эритроциты, 10 ¹² /л	3,08±0,9*	3,0±0,1*	1,8±0,08	3,0-6,0
Лейкоциты, 10 ⁹ /л	4,1±0,18*	5,5±0,19*	1,6±0,07	5,0-6,5
- палочкоядерные;	4,0±0,13*	4,0±0,17*	1,0±0,04	2,0-4,0
- сегментоядерные;	73±3,27*	71±3,2*	40±0,19	55-80
- эозинофилы;	3,0±0,16*	2,0±0,04*	1,0±0,03	2,0-6,0
- базофилы;	0	1,0±0,04*	2,0±0,1	0-4
- лимфоциты - 10 ⁹ /л;	20±0,8*	32±1,57*	4,0±0,17	20-60
- моноциты - 10 ⁹ /л;	3±0,15	10±0,49*	2,0±0,1	3-10

$P \leq 0.05$

Таким образом, в условиях экспериментальной цитопении применение новых соединений в малых дозах, период максимального снижения гематологических показателей либо в начальной фазе этого периода (опыты с облучением) и далее оказывало благоприятное влияние на состояние кроветворения экспериментальных животных за счет улучшения и ускорения процессов восстановления формулы крови.

Подводя итог приведенным в данном отчете экспериментальным данным, можно сделать заключение о возможности использования ГМДП в ИТ опухолей, успех которой обеспечивается возможно за счет 4 механизмов действия данного препарата:

- активация врожденного и адаптивного иммунитета через стимуляцию макрофагов;
- индукция экспрессии специфических антигенов на поверхности опухолетрансформированных клеток;
- потенцирование эффекта цитостатических препаратов;
- гемopoэтическая активность для восстановления показателей иммунитета после химио- и лучевой терапии.

Это ещё раз показывает нам способность стимулировать не только КОЕс, но и число иммунокомпетентных клеток, что является доказательной базой их иммуномодулирующего и гемокорригирующего влияния.

Изучение иммуномодулирующего действия К-48 на животных опухоленосителях в системе *in vitro* и *in vivo*

Иммунотерапия и профилактика опухолей основана на способах усиления иммунологического надзора. Среди факторов, способствующих прогрессии роста опухоли кроме иммунодепрессии необходимо отметить следующие:

Иммунологическая толерантность, которая связана с присутствием в геноме клеток организма онкорнавирусов в их неполной форме, которая

передается с зародышевыми (половыми) клетками родителей. Эти частицы в последующем и обеспечивают становление иммунологической толерантности, при которой не возникает препятствий для развития опухолевого процесса со стороны иммунной системы;

Дисбаланс между скоростью развития иммунного процесса и опережающим ростом опухоли, в результате которого происходит истощение регулирующего влияния на опухоль клона лимфоцитов, и возникает иммунологическая беззащитность организма по отношению к развивающейся опухоли;

Прогрессия опухоли также связана со снижением иммунных реакций, о чем свидетельствует угнетение функции Т-лимфоцитов лимфоузлов. Система В-лимфоцитов, угнетается в меньшей степени [7,8,9]. Исходя из вышеизложенного, одним из перспективных направлений и принципов профилактики и терапии опухолевого роста является применение иммуномодуляторов, способных нормализовать функционирование иммунной системы, тем самым снижать пролиферативную активность опухолевых клеток.

Иммуномодуляторы привлекают большое внимание исследователей в качестве препаратов для комплексной терапии больных злокачественными новообразованиями. Хорошо известны, и давно применяются в клиниках высокомолекулярные иммуностимуляторы, для которых характерен высокий неспецифический защитный эффект при инфекционных заболеваниях и неопластических новообразованиях, а также восстановление иммунокомпетентности при ряде патологических состояний. Однако, эти иммуностимуляторы в силу своей химической природы имеют ряд недостатков, основными из которых являются антигенность, пирогенность, токсичность (тошнота, рвота, увеличение температуры тела, снижение артериального давления, лимфопения - из-за прямого токсического действия на клетки, нарушение функций печени), а применение различных иммуностимуляторов у больных со

злокачественными новообразованиями, наряду с положительным действием на иммунную систему, могут оказывать негативный эффект усиления роста и развития опухолевого процесса.

Как известно, следствием лечения больных со злокачественными новообразованиями является подавление иммунитета противоопухолевыми препаратами [9,13,14,18].

Ранее было показано (10), что производные алкалоидов колхицина (К-48) и колхамина (К-42), проявляют высокую противоопухолевую активность, а также, что К-48 после лечения животных-опухоленосителей в терапевтической дозе не снижает, а несколько увеличивает количество АОК. В этой связи изучение иммуномодулирующих свойств новых производных колхицина, представляет большой интерес.

Исходя из вышеизложенного нами проведено изучение воздействия К-48 и К-42 на численность АОК при внутрибрюшинном (в/бр) и пероральном (р/ос) введении у животных-опухоленосителей. Поскольку LD50 при введении этого препарата per os более чем на порядок снижена, изучение противоопухолевой активности при этом способе введения начато с малых доз. Максимально переносимая доза (МПД) многократная для К-48 при в/бр введении составила 150 мг/кг, для применения р/ос действие препарата изучалось в дозе 250 и 125 мг/кг. Кроме этого, проводилось изучение действия К-48 в дозе 1 мг/кг per os и внутрибрюшинно, для определения собственного иммуномодулирующего действия препарата.

Изучение противоопухолевой активности проводилось на мышах линии BALB/C, которым перевивался штамм Саркомы-180. После перевивки штамма животным ежедневно 8-кратно вводили препарат в изучаемых дозах, после чего животных иммунизировали эритроцитами барана и изучали количество АОК по методу Erne и Nordin [30].

Одновременно определяли противоопухолевое действие препаратов в этих дозах. В опытах учитывали массу животных, массу опухоли и селезенки, количество спленоцитов и число АОК.

Как видно из таблицы 8, при в/бр изучении препарата К-48 в дозе 100 мг/кг был получен высокий противоопухолевый эффект 91,9% с резким увеличением числа АОК и спленоцитов. В дозе 1 мг/кг в/бр был получен достоверно значимый результат - 62,9%, при более значительном увеличении числа АОК. Препарат, введенный р/ос в этой же дозе, вызывал торможение роста опухоли на 62,5%, при этом он значительно увеличивал все изучаемые параметры. Доза препарата 250 мг/кг вызывала 70,9% торможения роста опухоли, а доза 125 мг/кг не вызывала противоопухолевого эффекта, однако способствовала увеличению всех остальных параметров. По-видимому, дозы, изученные нами при введении К-48 р/ос, были далеки от максимально переносимых (обычно 1/6 - 1/10 от LD50, и в этой связи вызывали меньший противоопухолевый эффект по сравнению с дозами, введенными внутрибрюшинно.

Увеличение числа АОК во всех случаях свидетельствует об их истинном иммуностимулирующем действии. Наиболее интересными, в данном опыте оказались дозы К-48 в/бр и р/ос - 1 мг/кг, которые не вызывали токсического действия, проявляли при этом высокий иммуностимулирующий эффект, при достоверном снижении росттормозящей активности опухолей. Исходя из полученных результатов при изучении иммуномодулирующего действия данных соединений можно сделать вывод что, препарат К-48 в отличие от природного аналога колхамина, обладает выраженным иммуностимулирующим действием с сохранением росттормозящего эффекта при различных способах его введения.

Полученные нами данные о способности К-48 увеличивать количество АОК, свидетельствующие о стимуляции иммунного ответа в ответ на опухолевые антигены, явились предпосылкой для более глубокого

изучения иммуномодулирующего действия препарата на животных-опухоленосителях *in vivo* и в системе *in vitro*.

Влияние соединений на численность АОК в селезенке животных-опухоленосителей

Таблица 16

Вещество	способ введения	доза, мг/кг	торможение роста опухоли, (%)	средняя масса селезенки, мг	Количество спленоцитов x 10 ⁶	число АОК
К-48	В/бр	100.0	91.9*	71.4 _± 3.3	133.3 _± 5.5	17.000 _± 720.0*
К-48	В/бр	1.0	62.9*	127.0 _± 6.2*	160.0 _± 3.7*	25.000 _± 800.0*
К-48	Per os	1.0	62.5*	111.0 _± 5.3*	180.0 _± 7.2*	20.000 _± 696.0*
К-48	Per os	250.0	70.9*	127.0 _± 6.2*	160.0 _± 2.8*	13.000 _± 680.0*
Колхамин	В/бр	2.0	28.3*	116,9 _± 5.7*	80.0 _± 3.0	4.600 _± 285.0*
Контроль	Per os			187.0 _± 9.2	140.0 _± 6.2	7.000 _± 280.0

* $P \leq 0,05$

ГЛАВА IV. ИЗУЧЕНИЕ ИММУНОМОДУЛИРУЮЩЕГО ДЕЙСТВИЯ ПРЕПАРАТА НА ЖИВОТНЫХ- ОПУХОЛЕНОСИТЕЛЯХ IN VIVO И В СИСТЕМЕ IN VITRO.

Для оценки биологического действия К-48 на поверхностные рецепторы Т-лимфоцитов были проведены исследования на периферической гепаринизированной крови (гепарин 10 Ед/мл) человека и животных в количестве 2-3 мл, из которой выделялись лимфоциты на градиенте плотности фиккол-верографин (1,077 г/л). Выделенные лимфоциты отмывали средой Хэнкса и при содержании 2×10^5 кл/мкл инкубировали с изучаемыми препаратами в концентрации 1 мкг/мл (по 50 мкл), (эта доза, в пересчете равная 1 мг/кг, при которой, как показано ранее, проявился иммуномодулирующий эффект) при 37⁰С в течение 30 минут. После инкубации препараты удаляли центрифугированием и соединяли со 100 мкл 0,5% эритроцитами барана (ЭБ). После центрифугирования в течении 2 мин, инкубации при 40С в течение 60 мин, фиксации глютаральдегидом и окраски по Дозморову-Задорожному проводили микроскопирование препаратов с подсчетом процента розеткообразующих лимфоцитов (РОЛ) (присоединивших 3 и более эритроцитов).

Для изучения показателей иммунного статуса в системе *in vivo* было проведено экспериментальное исследование на животных-опухоленосителях с перевивным штаммом Саркома-180.

Изучение показателей иммунного статуса проводили в циркулирующей крови (гепарин 10 Ед/мл) экспериментальных животных в день забоя. Исследования проведены согласно методическим рекомендациям Института иммунологии РФ и Института Иммунологии АН РУз [5,7,8,11] и включало: определение общего количества лейкоцитов и их фенотипирования с помощью моноклональных антител производства ИИ МЗ РФ: CD4, CD8, CD16, CD19 к поверхностным рецепторам субпопуляций иммунокомпетентных клеток: Т-хелперов/индукторов; Т-

супрессоров/киллеров; натуральных киллеров (НК) и В-лимфоцитов соответственно. Фагоцитарную активность нейтрофилов определяли по способности их фагоцитировать нейтральные частицы латекса размером 1,5 мк. С помощью реакции торможения миграции лимфоцитов (РТМЛ) по микрокапиллярам [8,15,22] определяли спонтанную миграцию лейкоцитов периферической крови (СМ ПК), в сыворотке крови определяли активность спонтанных цитокинов (СЦ), влияющих на миграцию лимфоцитов периферической крови (ЛПК) (сФУМ и сФСМ) активность Т-лимфоцитов по КонА-индуцированной продукции угнетающего и стимулирующего фактора миграцию лейкоцитов (ФУМ-л и ФСМ-л).

В таблице 17 представлены результаты основных параметров иммунного статуса экспериментальных животных-опухоленосителей при различных вариантах введения К-48, которые отражены на рисунках в виде диаграмм.

Полученные данные иммунологических параметров для группы интактных мышей линии В1 57/6 практически не отличались от аналогичных показателей, по отношению к здоровым животным. Поэтому они были приняты в качестве контроля I (К-1) для сравнения с группами животных-опухоленосителей.

По сравнению с контрольной группой у животных с перевивными опухолями наблюдалось снижение субпопуляции общих Т-лимфоцитов (CD3+), преимущественно за счет регуляторной субпопуляции Т-хелперов (CD4+) и повышения Т-супрессоров (CD8+) с нарушением соотношения CD4/ CD8 (до 1,09) (рис.1). Наблюдалось снижение фагоцитарной и миграционной активности лейкоцитов периферической крови (ПК). Снижение функциональной активности Т-клеточного иммунитета определено по уменьшению Кон А-индуцированной продукции цитокинов ФУМ-Л и ФСМ-Л (фактора угнетающего и фактора, стимулирующего миграцию лимфоцитов) (рис. 2). Вместе с тем, в сыворотке крови животных-опухоленосителей проявляется повышение активности

спонтанных цитокинов (сФСМ=-60%), что характерно при нарушении иммунного гомеостаза уже на ранних этапах экзо- или эндогенного воздействия.

У животных-опухоленосителей, получавших К-48 в дозе 100 мг/кг внутрибрюшинно под влиянием препарата наблюдалось повышение лейкоцитов на 46%, по сравнению с группой опухоленосителей и менее выраженное снижение количества Т-лимфоцитов. Под влиянием препарата К-48 определялось защитное действие на снижение регуляторных Т-хелперов (CD4) и нарастание Т-супрессоров (CD8) с более высоким иммунорегуляторным индексом (ИРИ) – 1,42 против 1,09 в группе, получавшей К-48 в дозе 100 мг/кг (рис.). Небольшое повышение содержания натуральных киллеров (CD16+) коррелирует со снижением фактора активации нейтрофилов (ФАН), но с повышением миграционной активности лейкоцитов периферической крови (ЛПК) (рис 1). Это отражает повышение активности естественных факторов защиты организма. Однако возрастающая активность сывороточных цитокинов способствует угнетению миграции ЛПК, в результате чего их миграционная активность *in vivo* почти не меняется.

Влияние препарата К-48 в различных дозах на иммунологические показатели экспериментальных животных с перевивным штаммом Саркомы - 180

Таблица 17

Показатели	Интактные животные	Контроль	К-48 100мг/кг в/бр	К-48 500 мг/кг р/о	К-48 1 мг/кг per/os
Лимф. Кл/мкл	1948±81*	812±99,0	1188±67,0*	2016±112,0*	1925±66,0*
CD3, %	45±1.32*	30±0.76	42±0.96*	40±1.34*	44±1.34*
CD4, %	31±1.38*	24±1.15	27±0.57	25±1.15	29±1.15*
CD8, %	15±0.57*	22±0.96	19±0.57*	15±0.76*	17±0.77*
ИРИ (CD4/ CD8)	2,07±0.09*	1,09±0.04	1,42±0.04*	1,67±0.01*	1,71±0.02*
CD16+ (НК), %	23±1.13	21±0.57	30±1.15*	30±1.53*	28±0.57*
CD19, %	24±0.72	20±1.15	23±1.53	20±0.96	20±1.34
ФАН, %	56±2.2	40±1.15	34±1.72	40±1.72	44±0.38
СМЛ ПК, ЕД	45,0±1.91*	25,0±1.92	45,0±1.92*	25,0±1.15	27,5±0.96
Сыв. Цит, ИМ	0,99±0.02*	1,60±0.03	0,77±0.03*	1,40±0.05	1,35±0.02*
ИУМ, %	+1%	-60%	+23%	-40%	-35%
ФУМ-Л, ИМ	0,55±0.03*	0,80±0.03	0,22±0.01*	0,54±0.06*	0,44±0.02*
ИУМ, %	+45%	+20%	+78%	+46%	+56%
ФСМ-Л, ИМ	1,20±0.05	1,15±0.04	0,88±0.04*	1,10±0.03	1,25±0.02*
ИУМ, %	-20%	-15%	+12%	-10%	-25%
ФУМ/ФСМ	2,25±0.10*	1,33±0.05	6,50±0.22*	4,60±0.19*	2,24±0.09*

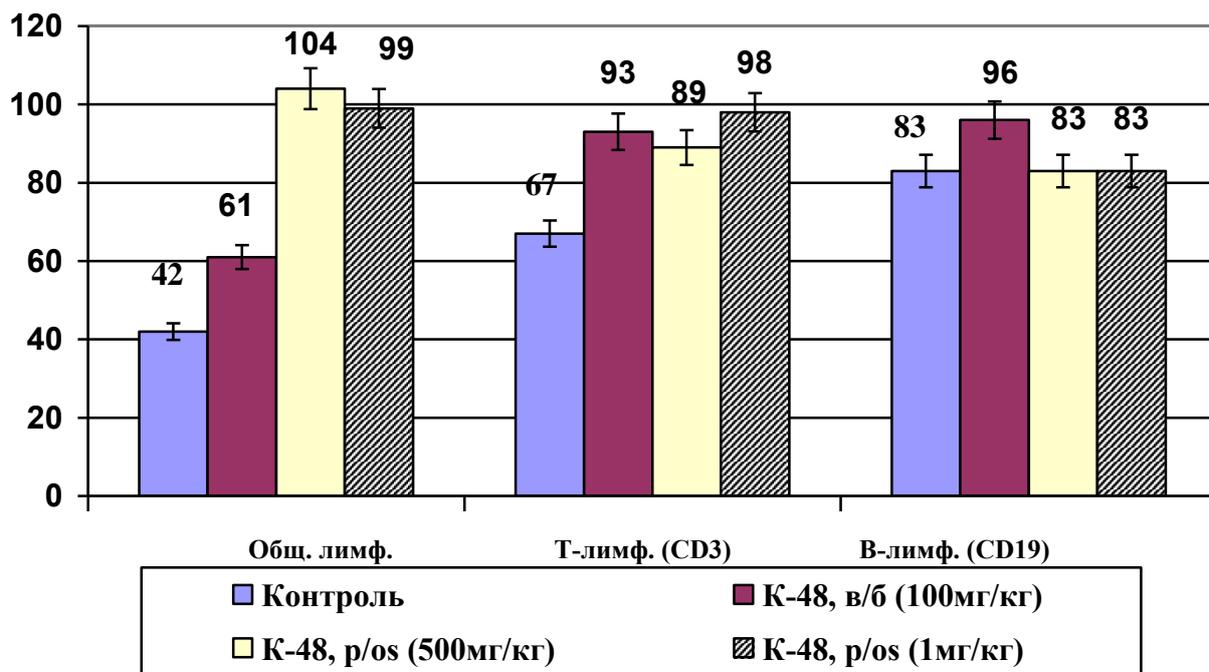


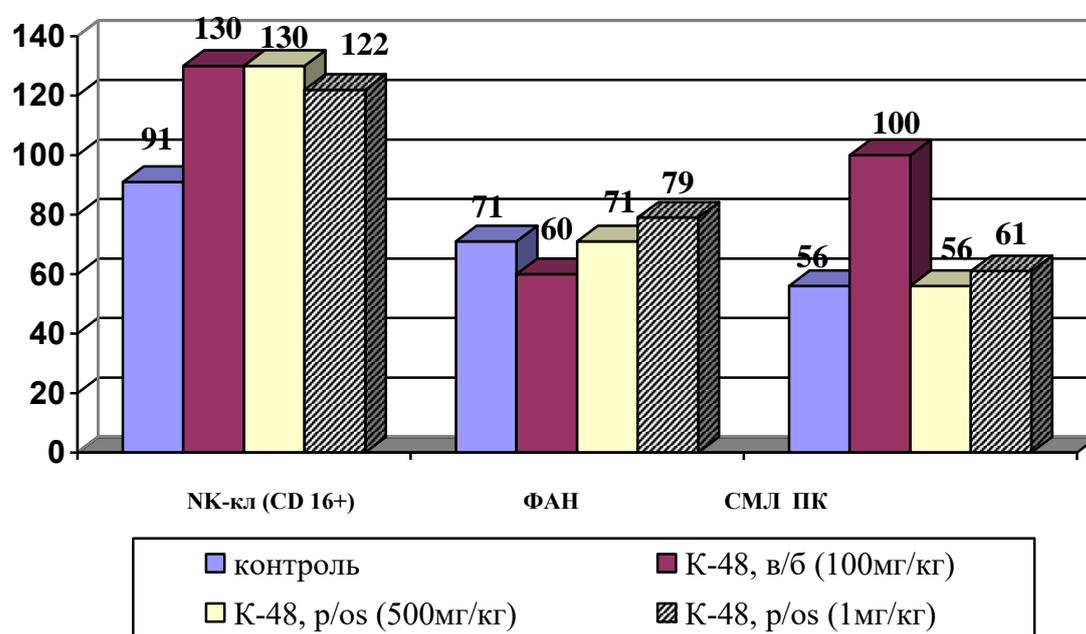
Рис.1. Изменение количества общих, Т- и В-лимфоцитов, под влиянием К-48 у животных-опухоленосителей

По сравнению с группой опухоленосителей под влиянием соединения К-48 наблюдается значительное увеличение Кон А-индуцированной продукции ФУМ-Д не только на оптимальную, но и субоптимальную дозу митогена. Это свидетельствует об увеличении функциональной активности клеток-продуцентов ФУМ-Л, то есть Т-лимфоцитов, осуществляющих реакции гиперчувствительности замедленного типа и, следовательно, противоопухолевый иммунитет. Однако, отсутствие продукции ФСМ-Л на субоптимальную дозу Кона, предполагает некоторые функциональные нарушения в иммунорегуляции, что видно из соотношения продукции ФУМ/ФСМ до 6,5 (рис3).

При введении экспериментальным животным препарата К-48 в дозе 500 мг/кг определяется достоверное увеличение общих лимфоцитов, но снижения процента субпопуляции CD3+кл (Т-лимфоцитов) (рис.1.). По-видимому, высокие дозы препарата, оказывают более выраженное действие на процесс кроветворения, увеличивая количество общих иммунокомпетентных клеток

(ИКК), но не процесс созревания Т-лимфоцитов, так как процент «нулевых» лимфоцитов при этом увеличивается (100%- (Т+В)). Высокие дозы препарата К-48 способствуют снижению миграционной активности ЛПК (СМЛ ПК+25,0+1,05ед), но положительным моментом действия препарата является появление в сыворотке цитокина с ФСМ-активностью (ИУМ=-40%), который усиливает миграцию клеток. Вместе с тем, хотя Кон А-индуцированная продукция ФУМ-Л по сравнению с предыдущей группой снижается, но на субоптимальную дозу Кон А регистрируется продукция ФСМ-л = -10%, что уменьшает соотношение ФУМ/ФСМ до 4,6 (рис.3).

Доза препарата К-48 1 мг/кг per os способствует увеличению количества общих ИКК, субпопуляции CD3+, CD4+ клеток, а также нормализации



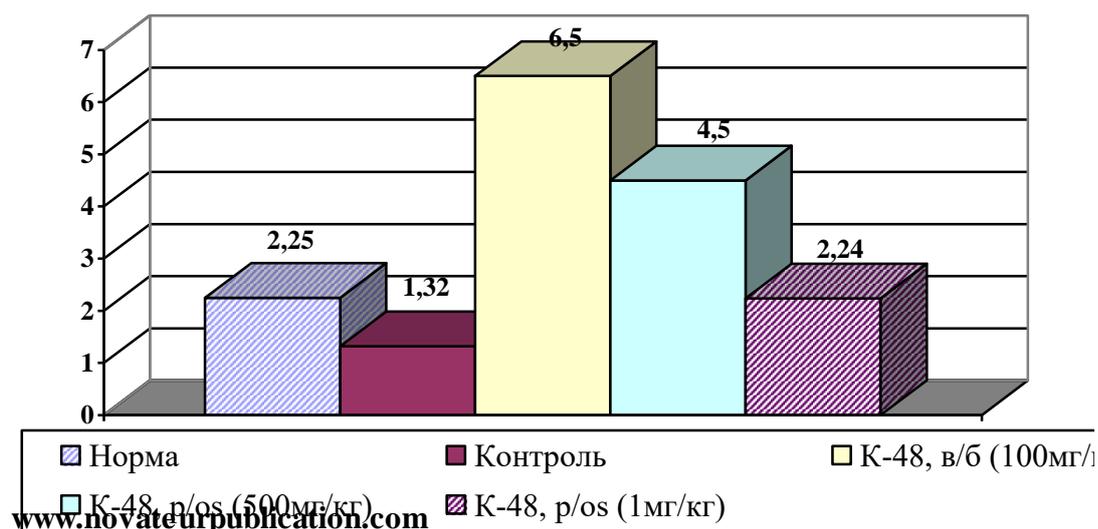
соотношения CD4/ CD8 (ИРИ=1,71) (рис.5).

Рис.2. Изменение функциональной активности ИК-клеток при воздействии соединения К-48 в разных дозах.

В этой дозе определяется повышение количества натуральных киллеров (CD16+кл), ФАН и СМЛ ПК, осуществляющих первую линию

противоопухолевой защиты, а также повышение функциональной активности Т-лимфоцитов, определяемой по Кон А – индуцированной продукции цитокинов ФУМ-Л (+56%) и ФСМ-Л (-25%) с нормализацией их соотношений (ФУМ/ФСМ=2,24). Для животных, получавших К-48 внутрибрюшинно в дозе 100 мг/кг,) (рис.7) отмечено достоверное значительное снижение количества общих лимфоцитов CD3+ кл, CD4+ клеток со снижением ИРИ. Также следует отметить, что в этой группе зафиксированы более низкие показатели CD16+ кл, ФАН и СМЛ ПК, характеризующие снижение показателей естественных факторов защиты. Однако наблюдается снижение активности сывороточных цитокинов (с ФСМ=22%) с нормализацией их, снижение активности Т-лимфоцитов на митоген Кон А-индуцированной продукции ФУМ-Л и ФСМ-Л (рис3).

Проведенные исследования влияния противоопухолевого препарата К-48 на изменение количественных и функциональных показателей ИКК экспериментальных животных с перевивным штаммом Саркома-180 показывает положительное его действие на уровень и соотношение параметров иммунного статуса (рис. 4). Однако, степень и направленность их зависит от вида препарата, его дозы и способа введения, а также от состояния иммунного статуса животных после перевивки, которая тоже является одним из факторов активации иммунной системы на введение чужеродных антигенов. Известно, что большинство противоопухолевых препаратов являются иммунодепрессантами, а также подавляют гемопоэз. На основании полученных



данных становится очевидным, что изученные препараты в разных дозах и при различных способах введения, не подавляя иммунную систему, стимулируя гемопоэз, сохраняют росттормозящую активность.

Рис.3. Соотношение продукции ФУМ к ФСМ лимфоцитов при применении К-48 в разных дозах

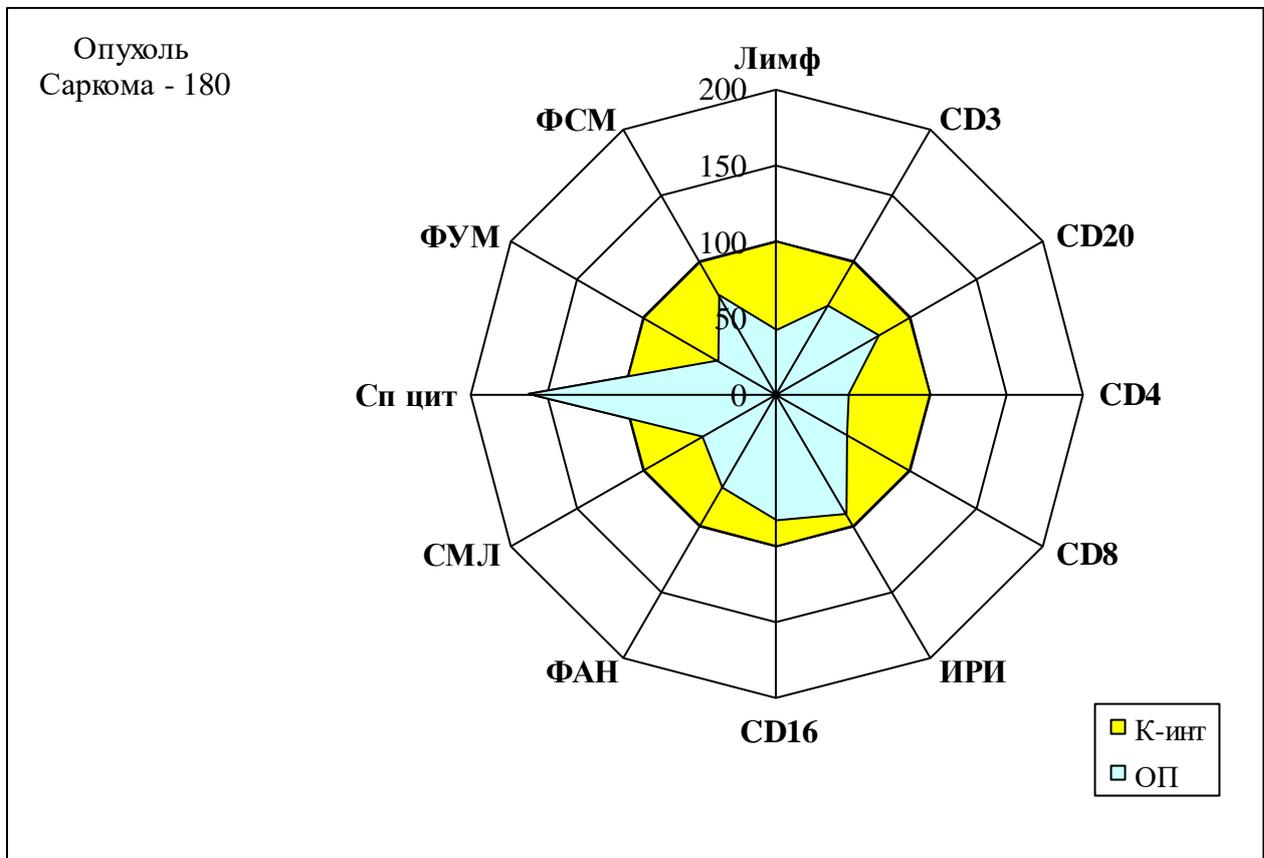


Рис. 4. Параметры состояния иммунокомпетентных клеток в группе контроля (интактные животные и опухоленосители).

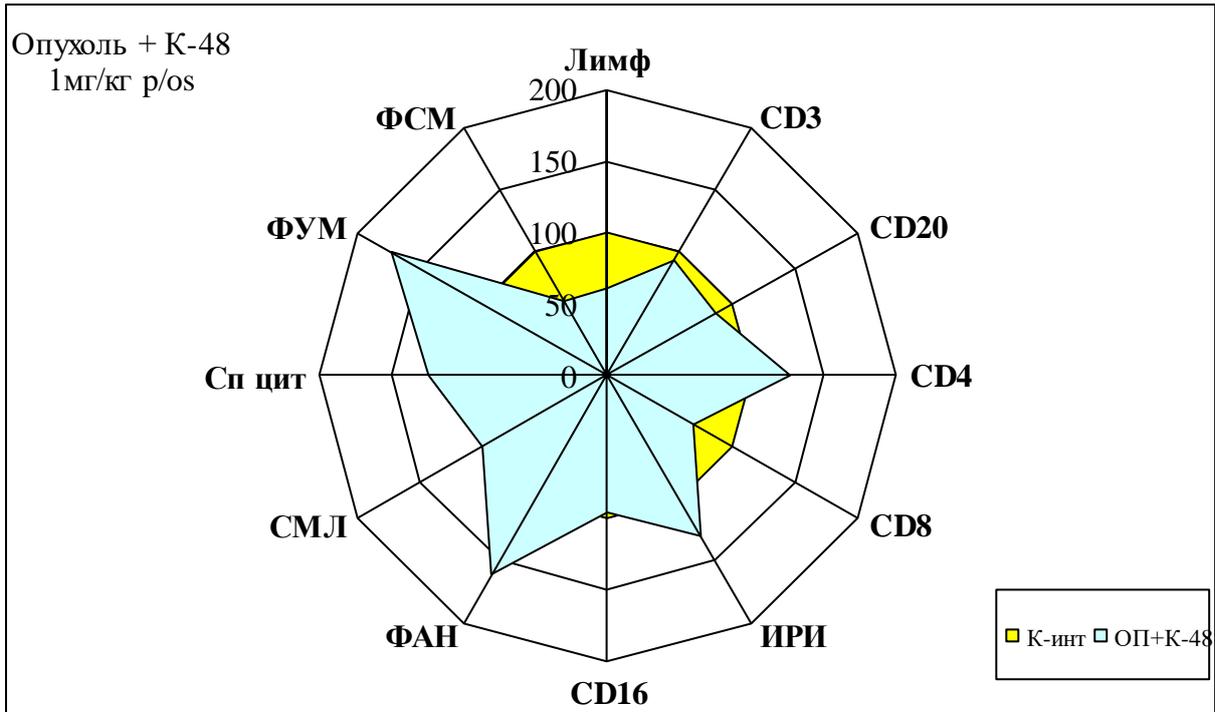


Рис. 5. Параметры состояния иммунокомпетентных клеток в группе с применением К-48 в дозе 1 мг/кг перорально.

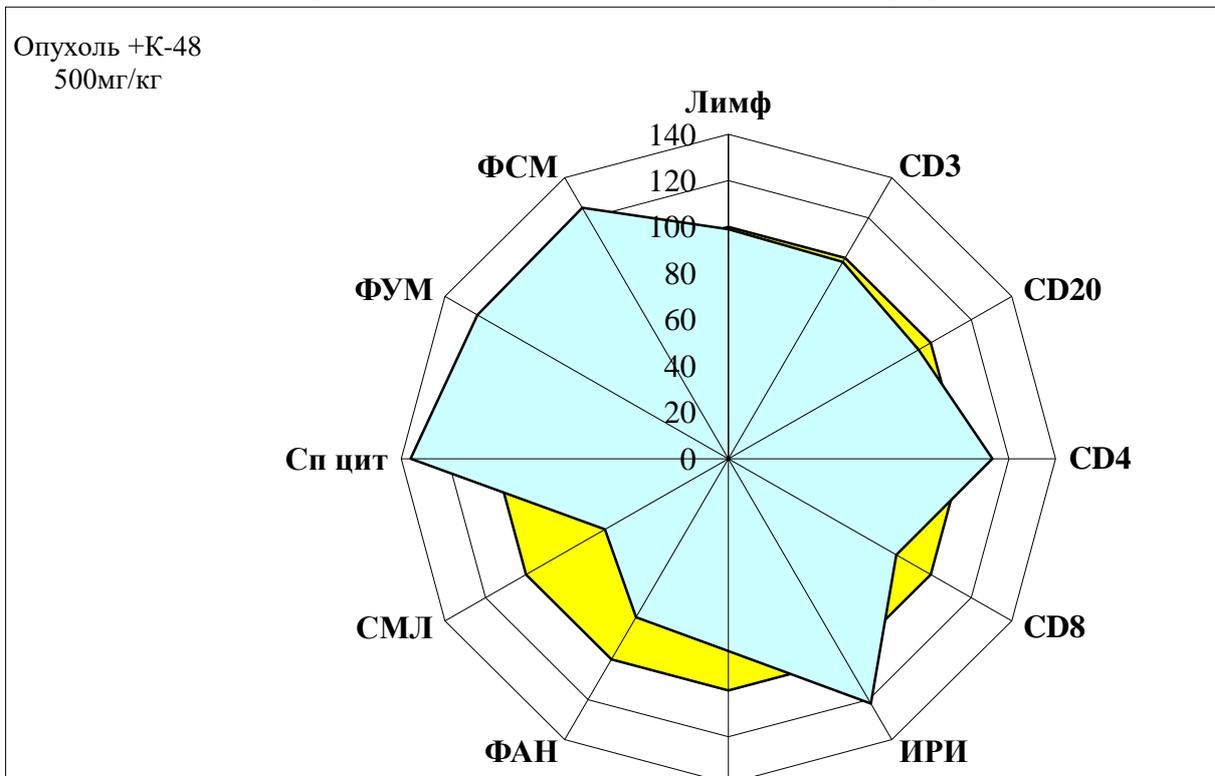


Рис. 6. Параметры состояния иммунокомпетентных клеток в группе с применением К-48 в дозе 500 мг/кг внутрибрюшинно.

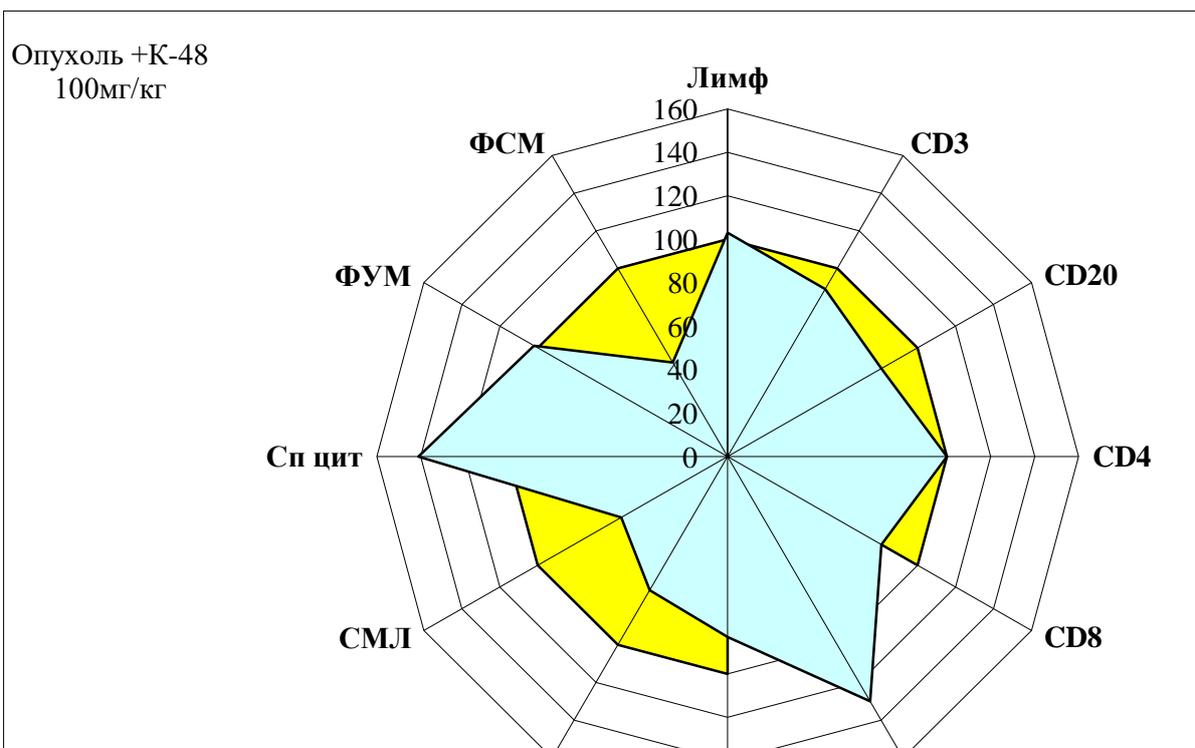


Рис. 7. Параметры состояния иммунокомпетентных клеток в группе с применением К-48 в дозе 100 мг/кг внутривенно.

К-48 в дозе 1 мг/кг способствует наиболее выраженной нормализации нарушенных звеньев иммуногенеза, возникающих при развитии опухолевого процесса. При клиническом испытании необходимо иметь в виду, что проявление действия препарата обычно связано с исходным состоянием иммунного статуса, биологическими и генетическими особенностями организма, что требует предварительных иммунологических исследований с проведением нагрузочных тестов.

Таким образом, результатом проведенных выше исследований является то, что новый противоопухолевый препарат К-48 в дозе 1 мг/кг, примененный как внутривенно, так и перорально стимулирует процессы дифференцировки и созревания стволовых кроветворных клеток, что приводит к нормализации показателей гемопоэза после проведенного химиолучевого лечения, причем противоопухолевый эффект, проявленный К-48 в этой дозе, реализуется через систему иммунитета.

4.1. Изучение противоопухолевой активности новых соединений

К-42 и К-48

Изучено противоопухолевое действие соединений при различных способах введения (внутрибрюшинно и пероральном) (таб.18). Известно, что, при некоторых способах введения противоопухолевая активность не проявляется.

В качестве контроля использовали животных с введением им физиологического раствора с добавлением 2% этилового спирта, как при приготовлении раствора препарата. Для дополнительного контроля применяли вещество К-48 при внутрибрюшинном введении в дозе 100 мг/кг, так как ранее было известно, что в этой дозе он проявляет выраженный росттормозящий эффект.

Соединения К-48 и К-42 растворяли сначала в нескольких каплях спирта (так как вещества труднорастворимы в воде): после чего добавляли стерильный 0,9% раствор NaCl, в результате получали раствор веществ в 2% этиловом спирте. Исследуемые вещества вводили различными способами, как перорально, так и внутрибрюшинно. Животные были разбиты на 8 групп. Лечение животных начинали через 48 часов после трансплантации опухоли, вещества вводились ежедневно в течение 8 дней.

Для оценки противоопухолевого эффекта новых соединений определяли следующие параметры: изменение среднего диаметра опухоли в процессе лечения; в конце лечения при забое животных определялись: процент торможения роста опухоли; изменение массы тела животных (с вычетом массы опухоли), масса селезенки; количество антителообразующих клеток, общий анализ крови. Критерием окончания опыта в ряде случаев служила некротизация опухолей в контрольной группе животных. Кроме этого, в экспериментах изучалось воздействие соединений на антителообразующие клетки (на штамме Саркома-180), гематологические показатели.

Наиболее показательным критерием эффекта действия вещества является индекс эффективности (ИЭ): отношение веса опухолей в контроле к массе

опухолей в опытной группе, так как он показывает, во сколько раз уменьшается масса опухолей в опытной группе по сравнению с контрольной. Так, 90% торможения роста опухоли соответствует уменьшению ее массы по сравнению с контролем в 10 раз, тогда как 96% торможения роста опухоли соответствует уменьшению ее массы в 25 раз [14].

Определение противоопухолевого эффекта новых соединений на опухолевом штамме Саркома-180 было проведено на мышах линии BALB/C. Для выявления зависимости доза-эффект этого вещества при пероральном способе введения были взяты дозы 1, 125 и 250 мг/кг. Если доза, введенная внутрибрюшинно (100мг/кг) составила примерно 1/15 от LD50 при внутрибрюшинном введении, то изучаемые дозы были: 1/10000, 1/80 и 1/40 от найденной экспериментально LD50 per os. Также в эксперименте это соединение изучалось в дозе 1 мг/кг внутрибрюшинно. Малые дозы (1 мг/кг) выбраны, исходя из того, что в этой дозе К-48 проявляет максимальное стимулирующее действие по отношению к выбросу колоний в селезенке (КОЕс) и выраженное иммуномодулирующее действие. Поэтому представляло интерес изучить воздействие препарата в этой дозе на опухоль, чего не было сделано ранее, поскольку нами предполагался возможный противоопухолевый эффект, который мог реализоваться через стимуляцию иммуногенеза.

Лечение животных-опухоленосителей начинали через 72 часа после трансплантации опухоли, вещества вводили в течение 8 дней. К-48 в дозе 100 мг/кг, введенный внутрибрюшинно проявил значительную противоопухолевую активность, что составило 91,97% с индексом эффективности (ИЭ) 12,46; где 16,6% опухолей рассосалось. Однако следует учитывать, что в данном эксперименте лечение начато не как обычно, а с третьего дня после перевивки и забой животных осуществлен не через 7 дней, а через 10 дней после последнего введения препарата. Это говорит о стабильности его действия (хорошей повторяемости в экспериментах), несмотря на несколько отсроченное введение препарата (72 часа) в сравнении с рядом экспериментов, проведенных нами

ранее (через 48 часов после инокуляции опухолевых клеток) и о сохранении противоопухолевого эффекта в течение более длительного времени.

По правилам Фармкомитета Узбекистана животные должны быть забиты не ранее, чем через 7 дней после окончания лечения, поскольку некоторые препараты проявляют свой эффект только во время лечения. Сохранение противоопухолевого эффекта в течение срока, превышающего неделю, свидетельствует о получении стабильной ремиссии.

Несмотря на то, что препарат увеличивал количество АОК в 2,5 раза, однако он негативно влиял на изменение массы тела (снижал на 11%) и более чем в 2,5 раза у животных этой группы способствовал уменьшению массы селезенки, в сравнении с контролем. Известно, однако, что размеры селезенки у интактных животных колеблются в пределах 60-90мг. В данном случае снижение массы селезенки по сравнению с контролем, где, по-видимому, наблюдается спленомегалия, свидетельствует о нормализации ее функции. К-48, введенный перорально в дозе 125 мг/кг не оказал противоопухолевого эффекта, при некотором увеличении массы тела, селезенки и почти в 3 раза количества АОК.

Противоопухолевая активность соединений на штамме Саркома-180
(лечение начато через 72 часа после перевивки опухоли; 8 введений веществ)

Таблица 18

Вещество	Доза, (мг/кг)	Способ введения	Масса тела		% изм. массы тела	Масса селезенки (мг)	Масса опухоли, (мг)	% тормож. роста опухоли	Индекс эффе- кности (ИЭ)	Кол. АОК
			до	после						
К-48	100	в/б	20,2 \pm 0.98*	17,88 \pm 0.78*	-11,48	71,4 \pm 3.2	113,4 \pm 5.1*	91,97	12,46	17000
К-48	250	р/о	20,3 \pm 0.95*	21,09 \pm 1.02	+3,89	127,0 \pm 6.1*	410,0 \pm 19.8*	70,88	3,43	13000
К-48	1	р/о	20,5 \pm 1.02	20,47 \pm 1.05	-0,14	111,0 \pm 5.2*	528,0 \pm 22.3*	62,50	2,66	20000
К-48	1	в/б	21,0 \pm 1.04	19,78 \pm 0.89*	-5,8	127,0 \pm 5.9*	522,0 \pm 23.2*	62,92	2,69	25000
К-42	40	р/о	20,3 \pm 1.0	17,11 \pm 0.68*	-15,7	93,2 \pm 4.2	389,0 \pm 18.9*	72,37	3,62	9000
Контроль	-	-	19,91 \pm 0.89	16,86 \pm 0.78*	-15,3	187,0 \pm 8.9*	1408 \pm 68.5	-	-	7000

*P \leq 0.05

По-видимому, эта доза оказывает иммуностимулирующий эффект, не проявляя влияния на торможение роста опухоли. Вдвое большая доза, 250 мг/кг, введенная перорально, также способствовала некоторому увеличению массы тела, селезенки, почти вдвое увеличивала количество АОК, но при этом способствовала весьма значительному торможению роста опухоли в 70,88% с ИЭ в 3,43. В этом случае столь значимый процент ингибиции роста опухоли при введении препарата перорально свидетельствует о возможности применения этого способа введения в дальнейшем в лечебных целях. Препарат, введенный в дозе 1 мг/кг как перорально, так и внутрибрюшинно проявил схожий результат порядка 62% торможения роста опухоли (ИЭ=2,6); однако, при пероральном применении не наблюдалось изменения массы тела, масса селезенки была на уровне интактного контроля и увеличивалось количество АОК в 2,86 раза. При внутрибрюшинном введении этой дозы количество АОК увеличивалось больше - в 3,57 раза, однако животные незначительно теряли в весе, а масса селезенки у них была 127 мг. Вероятно, в зависимости от пути введения препаратов они претерпевают различную биотрансформацию в системе организма, что и отражается на полученных результатах. Полученный не дозозависимый эффект препарата, где малая доза 1 мг/кг вызывала больший противоопухолевый эффект, чем доза 125 мг/кг, свидетельствует об иммуномодулирующем воздействии этого препарата в малых дозах.

Препарат К-42, примененный перорально в дозе 40 мг/кг, показал в данном эксперименте 72,37% торможения роста опухоли (ИЭ=3,62) и, в отличие от внутрибрюшинного применения в дозе 12 мг/кг, стимуляцию иммунитета, где количество АОК увеличилось в 1,29 раза, масса селезенки была на уровне нормы (интактного контроля), однако, животные также как и в контрольной группе опухоленосителей теряли массу тела на 15%. Полученный результат, как и с К-48, указывает на возможность перорального применения К-42 при лечении, так как он проявил

выраженное противоопухолевое действие, а найденная доза, составляющая 1/50 от его LD50 при пероральном введении, не является опасной для применения в противоопухолевой терапии.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В лаборатории по разработке противоопухолевых препаратов РСНПМЦОиР получен большой ряд (более 70) оригинальных веществ на основе митозтормозящих алкалоидов колхицина и колхамина, выделяемых из растений местной флоры. Вещества обладают меньшей токсичностью и высокой противоопухолевой активностью, механизм действия которых объясняется сочетанием антимиотического и алкилирующего механизмов действия.

На перевивной опухоли «Саркома – 180» при внутрибрюшинном введении показана высокая противоопухолевая активность **К-48**, которая превышает активность колхицина и применяемого в онкологии колхамина на 20-70%, при этом не снижает, а увеличивает количество АОК после проведенного лечения. При пероральном способе введения токсичность снижается на порядок. На штамме «Саркома 180» в дозах, составляющих 1/40-1/50 от найденных LD₅₀, показано торможение их роста соответственно на 72-62%. К-48, введенный в дозе 1 мг/кг как внутрибрюшинно, так и перорально подавлял рост этих опухолей на 50-62%, что определяется, вероятно, его иммуностимулирующей активностью. Цитогенетическое исследование этого препарата в терапевтических дозах показало отсутствие его мутагенного действия в отношении клеток костного мозга. Определена также способность препарата к стимуляции колониеобразования в селезенке (КОЕс).

Таким образом, имеющиеся вышеописанные данные, а именно: обнаружение у ряда новых веществ, и в наибольшей степени у К-48 способности к выраженной индукции стволовых клеток, явились предпосылкой к изучению механизмов действия нового оригинального противоопухолевого препарата с отсутствием иммуносупрессивных свойств, не только без воздействующего негативно на костный мозг, но, и возможно, потенцирующего индукцию костномозгового кроветворения

В ответ на поставленные задачи исследования, в настоящей работе изучались: способность препарата к индукции КОЕс, с последующим определением ростков кроветворения (СКК) и его влияния на иммунную систему (иммуномодулирующее действие) при внутрибрюшинном и пероральном применении новых производных в различных дозах.

В настоящей работе изучалась возможность стимуляции костномозгового кроветворения (СКК) с помощью К-48 после лучевого воздействия (доза 6- 8 Гр): изучено влияния этих соединений на состояние костного мозга и периферической крови, а также способности разнонаправлено влиять на процессы индукции СКК. К-48, а также при введении исходных алкалоидов колхицина и колхамина, которые вводились до облучения, однократно в различных дозах как внутрибрюшинно, так и перорально.

В результате эксперимента обнаружено, что введение мышам К-48 в разных дозах и способах введения после лучевого воздействия способствует увеличению количества микро- и макроколоний (КОЕс) в 5-10 раз, что возможно является основным механизмом гемо- и иммуностимулирующего действия.

Изучение влияния К-48 на восстановление состояния периферической крови и клеточности костного мозга после лучевого воздействия показало, что введение препарата приводит к восстановлению клеточности костного мозга и количества предшественников стволовых кроветворных клеток (СКК), причем полностью восстанавливается количество лейкоцитов в группах с применением препарата в дозе 1 мг/кг. В контрольной группе с облучением по сравнению с опытной группами отмечается уменьшение популяции КОЕ-с и практически полное отсутствие гранулоцитов в периферической крови, с уменьшением количества лейкоцитов в 4 раза.

Таким образом, однократное внутрибрюшинное введение препарата К-48 в дозе 1 мг/кг способствовало уменьшению повреждающего действия

проведенного облучения, и выраженной стимуляции образования мегакариоцитарного ростка костного мозга.

Изучение периферической крови у животных-опухоленосителей с перевитым штаммом Меланома В-16 после лечения К-48 **показало наличие** гемостимулирующее действие препарата - восстановление состояния периферической крови после проведенного лечения.

Выявлено коррегирующее влияние К-48 на проведенную химиолучевую терапию у животных-опухоленосителей, где применение К-48 после проведенной терапии также способствовало восстановлению состояния периферической крови, массы тела и селезенки животных, что позволяет подтвердить высказанные нами предположения о возможности применения этого препарата в качестве гемокорректора после проведенной химиолучевой терапии.

Изучение воздействия К-48 на параметры иммунной системы показало, что под влиянием препарата выявлено защитное действие на снижение регуляторных CD4 и нарастание CD8 с высоким (ИРИ) – 1,42. Также отмечено повышение активности естественных факторов защиты организма, с достоверным увеличением общих лимфоцитов, но со снижением процента CD3 при применении препарата в больших дозах.

По-видимому, высокие дозы препарата, оказывают более выраженное действие на процессы кроветворения, увеличивая количество общих лимфоцитов (ИКК). К-48 в дозе 1 мг/кг per os способствует увеличению количества общих ИКК, субпопуляции CD3+, CD4+ клеток, а также нормализации соотношения CD4/ CD8 (ИРИ=1,71), с повышением количества CD16+, ФАН и СМЛ ПК, осуществляющих первую линию противоопухолевой защиты, кроме того, повышается функциональная активность Т-лимфоцитов. Как известно, большинство противоопухолевых препаратов являются иммунодепрессантами, а также подавляют гемопоэз. На основании полученных нами данных становится очевидным, что изученный препарат в разных дозах и способах введения не подавляет

иммунную систему, стимулирует гемопоэз, сохраняя при этом росттормозящую активность, что особенно выражено при воздействии К-48 в дозе 1 мг/кг per os (1/10 000 от ЛД₅₀ – 50-62% торможения роста опухоли), которая способствует нормализации нарушенных звеньев иммуногенеза, возникающих при развитии опухолевого процесса.

Лечение мышей исследуемым препаратом после лучевого воздействия в сублетальной дозе способствовало восстановлению клеточности костного мозга и стимуляции роста КОЕс, индуцируя дифференцировку СКК в сторону образования гранулоцитарного или мегакариоцитарного ростков кроветворения, проявляя иммуномодулирующее действие, не вызывая токсического эффекта, а также проявляя противоопухолевую активность. Из проделанных экспериментов видно, что препарат в зависимости от способа введения и дозы проявляет различный механизм противоопухолевого действия: при внутрибрюшинном и пероральном введении высоких доз препарата (100 и 500 мг/кг) проявляется сильный цитостатический эффект с алкилирующим и иммуномодулирующим действием, а при воздействии малой дозы препарата (1 мг/кг), большую роль играют факторы, способствующие иммуномодуляции (через активацию и совершенствование функциональной активности клеток иммунной системы).

По-всей видимости, в процесс вовлекается активация системы интерлейкинов (IL), в частности IL-2, IL-3, которые играют большую роль в процессе созревания и дифференцировки клеток иммунной системы. (Т- и В- лимфоциты). Как видно из полученных данных, новые производные в зависимости от способа их введения и дозы оказывают воздействие на тонкие механизмы, способствуя нормализации функциональной активности иммунной системы, тем самым осуществляя восстановление утраченных её способностей осуществлять противоопухолевую защиту.

В Ы В О Д Ы:

1. Введение мышам К-48 в разных дозах и способах введения способствуют увеличению количества микро- и макроколоний (КОЕс) в 5-10 раз.
2. Изучение воздействия К-48 на колониобразующие единицы в селезенке с определением ростков стволовых кроветворных клеток показало, что по сравнению с облученными животными, К-48 в дозе 1 мг/кг стимулирует образование гранулоцитарных в 15 и мегакариоцитарных колоний в 10 раз, а в дозе 100 мг/кг стимулирует образование эритроидных - в 8,5 и гранулоцитарных колоний – в 9,7 раза по отношению к контрольным животным с облучением, а также восстанавливает все ростки кроветворения, значительно стимулируя мегакариоцитарные колонии, поднимая их уровень в 15 раз.
3. Влияние К-48 после лучевого воздействия проявляется в восстановлении состояния периферической крови и клеточности костного мозга и полного восстановления количества лейкоцитов в периферической крови
4. Выявлено корригирующее влияние К-48 на проведенную химиолучевую терапию у животных- опухоленосителей, где применение К-48 после проведенной терапии способствовало восстановлению состояния периферической крови, восстановлению массы тела и селезенки животных, что позволяет подтвердить высказанные нами предположения о возможности применения этого препарата в качестве гемокорректора после проведенной химиолучевой терапии.
5. Изучение воздействия К-48 на параметры иммунной системы выявило защитное его действие на снижение регуляторных CD4 и нарастание CD8 с высоким (ИРИ) – 1,42. Также отмечено повышение активности естественных факторов защиты организма, а также определяется достоверное увеличение общих лимфоцитов, но снижение процента CD3 при применении препарата в больших дозах.

6. К-48 в дозе 1 мг/кг per os способствует увеличению количества общих ИКК, субпопуляции CD3+, CD4+ клеток, а также нормализации соотношения CD4/CD8 (ИРИ=1,71), с повышением количества CD16+, ФАН и СМЛ ПК, осуществляющих первую линию противоопухолевой защиты, кроме того, повышается функциональная активность Т-лимфоцитов.
7. Изученный препарат в разных дозах и способах введения не подавляет иммунную систему, стимулируют гемопоэз, сохраняя при этом росттормозящую активность, что особенно выражено при воздействии К-48 в дозе 1 мг/кг per os (1/10 000 от ЛД₅₀ – 50-62% торможения роста опухоли), которая способствует нормализации нарушенных звеньев иммуногенеза, возникающих при развитии опухолевого процесса, по всей видимости это связано с активацией системы интерлейкинов, в частности ИЛ-2, ИЛ-3, которые влияют на процесс дифференцировки клеток иммунной системы.
8. Препарат в зависимости от способа введения и дозы проявляет различный механизм противоопухолевого действия: при внутривнутрибрюшинном и пероральном введении высоких доз препарата (100 и 500 мг/кг) проявляется сильный цитостатический эффект с алкилирующим и иммуномодулирующим действием, а при воздействии малой дозы препарата (1мг/кг), по-видимому, большую роль играют факторы, способствующие иммуномодуляции (через активацию и совершенствование функциональной активности клеток иммунной системы).
9. К-48 в зависимости от способа введения и дозы оказывает воздействие на тонкие механизмы, способствуя нормализации функциональной активности иммунной системы, тем самым, осуществляя восстановление утраченных способностей иммунной системы осуществлять противоопухолевый иммунитет.

Список использованной литературы:

1. Аткинсон А.Дж. Принципы клинической фармакологии. – М.: Прак. мед. 2013. – 556 с.
2. Балуца В.П., Сушкевич Г.И., Лукомнова Т.И. Действие радиации на систему гемостаза. ВДНХ СССР, павильон «Атомная энергия» Москва, 1981, с.1.
3. Беленький М.Л. Элементы количественной оценки фармакологического эффекта. – Л.: Медгиз, 2019. – 151 с.
4. Воробьев А.И., Лорие Ю.И. Руководство по гематологии. - М. Медицина. 2019 - 584с.
5. Выпова Н.Л. Влияние алкалоида на тромбоцитопоз. Автореферат дис. Кандидата биол. Наук. Ташкент, 2020г.
6. Дагай А.М., Гольберг Е.Д., Агафонов В.И. Регенерация гемопоэза в условиях облученного организма Бюллетень экспериментальной биологии и медицины – 2013, Т.96. №11, с.102-103.
7. Долгих В.Т. Опухолевый рост (избранные лекции) – Москва: Издательство Медицина, 2001. - С. 55-56.
8. Еникеева З.М. «Противоопухолевая активность и другие биологические свойства новых производных колхицина и колхамина».: автореферат Дис. : докт.биол.наук - Ташкент.- 2000.
9. Зайчик А. Ш., Полетаев А. Б., Чурилов Л. П. Распознавание «своего» и взаимодействие со «своим» как основная форма активности адаптивной иммунной системы // Вестн. С.-Петерб. ун-та. Сер. 11. Медицина. 2013. № 1. С. 6–27.
10. Лакин Г.Ф. Биометрия. - М.: Высшая математика. - 1973. - С.26-125.
11. Лефковитса И., Козенца У. Исследование антителообразующих клеток методом локального гемолиза в геле // Методы исследования в иммунологии / Под ред. И.Лефковитса, Б.Перниса. - М. -1981. -С.288-289.
12. Лушнинков Е.Ф., Абросимов А.Ю. //Гибель клетки (апоптоз).- Москва «Медицина» - 2021.
13. Матэ Ж., Активная иммунотерапия рака, иммунопрофилактика и иммунореабилитация., Москва. - М.-1980.
14. Новикова И.А., Ходулева С.А., // В кн. «Клиническая и лабораторная гематология» 2013г., Издательство «Коста», С.8-17
15. Переверзев А.Е. Кроветворные колониеобразующие клетки и физические стресс-факторы. Ленинград, изд. «Наука». - 1986.
16. Пинегин Б.В. Хаитов.Р.М. Современные иммуномодуляторы: основные принципы их применения // Иммунология. - 2014.-№ 5.-С.4-7

- 17.Першин С.Б., Пинегин Б.В., Утешев Б.С. Влияние колхицина на популяции антителообразующих клеток при вторичном иммунологическом ответе// Ж. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол. 2021. -№1. -С.129-132.
- 18.Проценко Л.Д., Булкина З.П. Химия и фармакология синтетических противоопухолевых препаратов. – Киев: Наук. Думка, 2021. – 263 с.
- 19.Шиггин В.П. Патогенетическое значение цитокинов и перспективы цитокиновой/антицитокиновой терапии. Клиническая гепатология и иммунология Т.6, №4, 2020.
- 20.Barth N., Galaska A.B., Rudnick S.A. //Principles of Cancer Biotherapy/ Ed. R.K. Oldham. New York.- 2019 - P. 412-417.
- 21.Delneste Y., Beauvillain C., Jeannin P. Innate immunity: structure and function of TLRs. Med Sci (Paris) 2020; 23(1): 67–73
- 22.Mule J., Shu S., Rosenberg S.A. The antitumor efficacy of lymphokineactivated killer cells and recombinant interleukin-2 in vivo// J. Immunol-2015.-V. 135. - P. 646-652.
- 23.Patel R., Williams C., Patel D. T-cell subset determination in normal peripheral blood: comparison of the indirect immunofluorescence and lymphocytotoxicity techniques. /Experientia - 2019.-Vol.40 - P.1412-1413.
- 24.Prehn R Tumor progression and homeostasis // Advance Cancer Res. - 2006.- V.23 - P. 203-236.
- 25.Pejawar-Gaddy S., Finn O. Cancer vaccines: accomplishments and challenges. Crit.Rev Oncol Hematol 2008; 67: 93–102
- 26.Peter V. Haen - Principles of Hematology., 2021 p.256.
- 27.Rosenberg S.A., Restifo N.P., Yang J.C., et al. Adoptive cell transfer: a clinical path to effective cancer immunotherapy. Nat Rev Cancer 2018; 8(4): 299–308.
- 28.Ruscetti F.W. Biology of interleucin-2 //Surv. Immunol. Res. - 2019.- V.3. - P.122-126.
- 29.Steplewski Z., Lubeck M.D. Human macrophages armed with murine immunoglobulin G2a antibodies to tumors destroy human cancer cells // Sciens. - 2019.-V. 221. - P. 865-867.
- 30.Till J.E., Mc Culloch E.A. A direct measurement of the radiation sensitivity of normal mouse bone marrow cells //Radiat. Res. -1961.- V.14. -No1. - P.213-222.
- 31.Waldmann T.A. Immunotherapy: past, present and future. Nat Med 2013; 9(3):269–77.

ПРИЛОЖЕНИЕ

Определение числа антителообразующих клеток (АОК)

Метод основан на образовании вокруг клеток, продуцирующих антитела с высокой гемолитической активностью (IgM-антитела), сферической зоны лизиса после добавления антигена и комплемента. Существует значительное количество модификаций метода Эрне и Нордина, поэтому исполнители могут выбирать вариант, оптимально отвечающий задаче конкретного исследования.

Мышам вводят внутрибрюшинно или внутривенно суспензию трижды отмытых в стерильном физиологическом растворе эритроцитов барана (ЭБ) в субоптимальной дозе, равной 5×10^7 ЭБ/мышь. Рекомендуются, чтобы пути введения антигена и тестируемого препарата различались. Поэтому препарат согласно предполагаемому способу клинического использования вводят иным путём в 2 дозах по схемам. На 5 сутки после иммунизации при внутрибрюшинном введении (на 4-е сутки после внутривенной иммунизации) определяют число АОК в селезёнке. Целесообразно также проведение реакции локального гемолиза на предмет обнаружения возможного влияния на спонтанное бляшкообразование (в эксперимент добавляют 3 группы без введения ЭБ: две с введением препарата и одна - интактные животные). Наличие эффекта поликлональной активации будет свидетельствовать о риске развития аутоиммунного состояния.

Постановка реакции. Животных подвергают эвтаназии с помощью цервикальной дислокации, извлекают селезенки и готовят клеточную суспензию при помощи стеклянного гомогенизатора. Суспендирование проводят в растворе Хенкса (pH 7,2-7,4) в объёме 5 мл на холоде. Приготовленную суспензию фильтруют через 1 слой капрона и помещают в холодильник.

Приготовление агарозной смеси. Расплавленную в дистиллированной воде 2 % агарозу (пригодна агароза различных фирм)

добавляют к равному объему нагретого до 45-48°C однократного и двукратного (10-кратный концентрат, разведённый в 5 раз дистиллированной водой) раствора Хенкса. Соотношение компонентов смеси – 1:1:1. В приготовленную таким образом агарозу вносят суспензию ЭБ (концентрация 6-8 млрд/мл) из расчёта 70-80 млн. клеток на 1 мл агарозной смеси. По 2,75 мл полученной смеси разливают по пробиркам, предварительно помещённым в водяную баню с температурой 46-48°C. Далее в пробирки, содержащие агарозу с ЭБ, вносят определённое количество суспензии селезёночных клеток (как правило, 0,05-0,2 мл), желательнее определить его в предварительных опытах. Содержимое пробирок встряхивают и выливают на чашки Петри (диаметр чашки 100 мм). Осторожным покачиванием и вращением смесь равномерно распределяют по дну чашки. После застывания агарозы чашки помещают в термостат при 37,5°C на 1 час. Затем на поверхность агарозы в чашках наливают по 3 мл раствора сухого компонента морской свинки (разведение в физиологическом растворе 1:5) и вновь инкубируют в термостате при 37°C в течение 45 мин. После инкубации компонент сливают и проводят подсчёт образовавшихся бляшек (зон гемолиза). При относительно небольшом числе бляшек (примерно до 120 на чашку) их подсчитывают полностью. Если же бляшек больше, то их подсчёт производят следующим образом. В листе плотной чёрной бумаги вырезают отверстие в форме квадрата со стороной 1 см (т.е. площадью 1 см²). Подкладывая лист с вырезанным квадратом под доньшко чашки, просчитывают выборочной число бляшек в 10 таких квадратах в разных участках чашки с последующим перерасчётом на всю поверхность агарозы в чашке (коэффициент перерасчёта для чашек диаметром 100 мм равен 6,88). Зная объём клеточной суспензии, наносимый на чашку, и общий объём селезёночной суспензии вычисляют количество бляшек (АОК) на всю селезёнку.

При статистической обработке полученных данных определяют среднюю геометрическую числа АОК, и стандартную ошибку. При сравнении результатов применяют критерий t Стьюдента. Достоверными считают различия при $P < 0,05$. При постановке экспериментов необходимо использовать не менее 6-10 животных в группе. Итоговые результаты являются суммарными показателями по крайней мере 2 опытов.

Реакцию Эрне можно заменить определением на 7 сутки после иммунизации титра антител в сыворотке крови мышей с помощью реакции гемагглютинации.

Определение массы и клеточности органов иммунной системы

Мышей подвергают эвтаназии с помощью цервикальной дислокации, извлекают тимус, селезёнку, лимфатические узлы и трубчатые кости. Лимфоидные органы взвешивают и с помощью стеклянного гомогенизатора, готовят клеточную взвесь на среде 199 или на растворе Хенкса (рН 7,4). Полученную суспензию фильтруют через 2 слоя капрона и дважды отмывают путём центрифугирования при 200g в течение 5 мин. Средой 199 из костей вытесняют и затем гомогенизируют костный мозг. Далее подсчитывают концентрацию ядросодержащих клеток (ЯСК) в 3% уксусной кислоте. Результаты выражают в абсолютных единицах числа ЯСК в органе и в относительных значениях по отношению к массе органа.

Исследование спонтанной и индуцированной митогенами пролиферации спленоцитов

Иммуностропные, митогенные свойства исследуемых препаратов можно оценить с помощью реакции бласттрансформации лимфоцитов. Использование этого подхода с применением Т- и В-клеточных митогенов позволит также оценить преимущественное влияние фармпрепаратов на Т- или В-клеточные популяции лимфоцитов.

Постановка реакции. Животных опытных и контрольных групп забивают с помощью цервикальной дислокации, извлекают селезёнки и готовят

клеточную суспензию при помощи стеклянного гомогенизатора. Полученные спленоциты отмывают средой 199 с 5% сыворотки крупного рогатого скота и по 200 мкл клеточной взвеси (с концентрацией 2×10^6 /мл) в среде RPMI-1640 (Flow, Англия), дополненной 10% эмбриональной телячьей сыворотки (Gibco, США), 0,01 М буфера HEPES (Gibco, США), 200 мМ L-глутамина (Sigma, США), 10 μ М 2-меркаптоэтанола (Merck, ФРГ), 100 мг/мл стрептомицина и 100 ед/мл пенициллина вносят в лунки 96-луночных планшетов. В часть лунок одновременно вносят митогены (ФГА, ЛПС) в предварительно оттитрованных концентрациях (10-20 мкг/мл). Контрольные лунки митогена не содержат. При наличии инъекционной или растворимой формы исследуемого препарата проводят оценку их митогенных свойств, помещая в различных концентрациях в лунки, содержащие спленоциты интактных животных. Внесение же препаратов в максимальной, не митогенной концентрации в культуру спленоцитов животных, получивших препарат, позволит судить о возможности сенсibilизации организма животных к препарату в случае повышения пролиферации при повторной контакте с препаратом спленоцитов животных опытных групп.

Затем селезеночные клетки инкубировали в течение 96 часов в атмосфере 5% CO₂, при температуре 37,5 °С и за 24 часа до окончания культивирования в лунки добавляли по 1 мкКи раствора ³H-тимидина в объеме 10 мкл. Интенсивность включения ³H-тимидина (число импульсов/мин) определяли в клетках, собранных с помощью Cell Harvester (Flow), на сцинтилляционном счетчике (Marck-III). Уровень РБТЛ спленоцитов под влиянием митогенов или вносимых в среду культивирования препаратов оценивали по отношению к интенсивности РБТЛ спленоцитов в среде, не содержащей митогены или используемые препараты. Для оценки влияния препаратов на РБТЛ сравнивали величину включения ³H-тимидина клетками селезенки мышей, получивших препараты, с таковой спленоцитов мышей, получивших

физиологический раствор (ФР). Результаты выражают в значениях импульсов в минуту.

Стволовые кроветворные клетки: общие сведения

В связи с огромным количеством клеток крови, продуцируемых при нормальном кроветворении (у взрослого человека около 1/3 триллиона в сутки) казалось само собой разумеющимся, что в основе такого интенсивного процесса новообразования клеток должна находиться клетка или клетки, способные к самовоспроизводству, т.е. бессмертные клетки, дочерние элементы которых могут не отличаться от исходной как по пролиферативному потенциалу, так и по набору доступных дифференцировок. Отсюда крайне простое и в то же время строго логичное определение: любая клетка, обладающая по меньшей мере двумя свойствами, а именно, способностью к самоподдержанию и способностью к дифференцировке (не важно, в одном или в нескольких направлениях) является стволовой клеткой любой обновляющейся ткани (кроветворная система, кожа, кишечник и др.). Стволовые клетки способны восстанавливать кроветворение у облученных животных (радиозащитное действие), длительно поддерживать кроветворение и образовывать колониеобразующие единицы селезенки (двенадцатидневные селезеночные колонии), дающие начало гранулоцитарным, моноцитарным, эритроидным, мегакариоцитарным и лимфоидным колониям.

Все клетки гемопоэтического происхождения образуются из примитивных стволовая кроветворная клеток (пСКК), локализованных в костном мозге (см. СХЕМУ) и дающих начало клеткам четырех основных направлений дифференцировки:

- эритроидного (эритроциты),
- мегакариоцитарного (тромбоциты),
- миелоидного (гранулоциты и моноядерные фагоциты) и
- лимфоидного (лимфоциты).

Дивергенция общего стволового элемента происходит на самом раннем этапе костномозговой дифференцировки.

Антигенпрезентирующие клетки в основном, но не исключительно, развиваются из миелоидных клеток-предшественников.

Клетки миелоидного и лимфоидного ряда наиболее важны для функционирования иммунной системы.

Лимфопоэтическая стволовая клетка определяет две самостоятельные линии развития, приводящие к образованию T-клеток и B-клеток.

Первая образующаяся из ГСК клетка-предшественник представляет собой колониобразующую единицу (КОЕ), которая определяет линии развития, приводящие к образованию гранулоцитов, эритроцитов, моноцитов и мегакариоцитов. Созревание этих клеток происходит под влиянием колониестимулирующих факторов (КСФ) и ряда интерлейкинов, в том числе ИЛ-1, ИЛ-3, ИЛ-4, ИЛ-5 и ИЛ-6. Все они играют важную роль в положительной регуляции (стимуляции) гемопоэза и продуцируются, главным образом, стромальными клетками костного мозга, но также и зрелыми формами дифференцированных миелоидных и лимфоидных клеток. Другие цитокины (например, ТРФ-бета) могут осуществлять понижающую регуляцию (подавление) гемопоэза).

У всех клеток как лимфоидного, так и миелоидного ряда время жизни ограничено, и все они непрерывно образуются. У млекопитающих в период внутриутробного развития ГСК присутствуют в желточном мешке, печени, селезенке и костном мозге. Во взрослом организме гемопоэтические стволовые клетки находятся в основном в костном мозге, где они в норме довольно редко делятся, производя новые стволовые клетки (самообновление). Животное можно спасти от последствий облучения в летальных дозах введением клеток костного мозга, которые заселяют его лимфоидную и миелоидную ткани.

Плюрипотентные стволовые клетки дают начало коммитированным клеткам-предшественницам, которые уже необратимо определились как предки кровяных клеток одного или нескольких типов.

Стволовая клетка плюрипотентна, т.к. дает начало многим видам терминально дифференцированных клеток.

Сайт: <http://medbiol.ru>