



УДК 547.962+577.113.3

3'-ДЕЗОКСИ-3'-ФТОРАНАЛОГИ КОРОВЫХ ТРИМЕРОВ 2-5А: ВЛИЯНИЕ НА ЛИТИЧЕСКУЮ АКТИВНОСТЬ НК-ЛИМФОЦИТОВ ЧЕЛОВЕКА

© 1999 г. Е. Н. Калининченко, Т. Л. Подкопаева, М. Келве*, М. Саарма*, И. А. Михайлопуло*

Институт биоорганической химии, Национальная Академия наук Беларуси,
220141, Минск, ул. Купревича, 5/2, Беларусь;

* Институт химической физики и биофизики, АН Эстонии, 200026, Таллинн, Эстония

Поступила в редакцию 13.03.98 г.

Принята к печати 21.07.98 г.

Влияние коровых тримеров – аналогов (2'-5')олигоадениловой кислоты, содержащих 9-(3-дезоксидеокси-3-фтор-β-D-ксилофуранозил)аденин (A^F) и 3'-дезоксидеокси-3'-фтораденозин (A_F) в различных положениях цепи олигомера, на литическую активность клеток естественных киллеров человека (НК-клетки) было изучено тремя различными методами. Клеточная цитотоксичность определялась высокочувствительным нерадиоактивным методом с использованием хелатного комплекса диэтилентриаминопентауксусной кислоты с европием, Eu-DTPA. Показано, что все фтордезоксидеоксианалоги повышают литическую активность индивидуальных НК-лимфоцитов, что следует из значений константы скорости лизиса k_2 . В то же время, замещение центрального аденозинового фрагмента или, в большей степени, 5'-терминального остатка (2'-5')A₃ на A^F вызывает уменьшение числа действующих НК-клеток, что приводит к потере способности повышать активность естественных киллеров по сравнению с природным коровым тримером. В противоположность этому, изомерные *рибо*-аналоги, (2'-5')(A_F)A₂ и (2'-5')A(A_F)A, и тримеры, у которых 2'(3')-терминальный нуклеотид был замещен на A^F или A_F повышали активность НК-клеток так же или более эффективно, чем природный тример, (2'-5')A₃. Принимая во внимание, что изомерные *ксило*- и *рибо*-3'-дезоксидеокси-3'-фтораналоги (2'-5')A₃ являются стереохимически модифицированными олигомерами, полученные данные однозначно указывают на важность пространственной структуры этих тримеров в повышении литической активности НК-клеток.

Ключевые слова: 2-5А-тример, 3'-дезоксидеокси-3'-фтораналоги, НК-клетки; литическая активность; цитотоксичность, кинетика; нерадиоактивный (Eu³⁺)-метод.

Естественные киллеры (НК-клетки) осуществляют независимый от антител и комплемента лизис практически любых опухолевых и инфицированных вирусом клеток-мишеней без предварительной иммунизации [1, 2]. Имеется ряд сообщений о способности интерферона (IFN) регулировать литическую активность естественных киллеров [3, 4], что рассматривается как один из основных факторов его противоопухолевого действия [5]. Важная роль 5'-трифосфорилированных (2'-5')олигоаденилатов [ppp5'A2'p(A2'p)_nA, n = 1–5, главным образом тример, n = 1; 2-5А] в противо-

вирусном действии интерферона в настоящее время общепризнана [6–8] (схема 1). 2-5А-система, вероятно, не определяет все биологические эффекты IFN, однако имеются разнообразные доказательства того, что 2-5А, как и 5'-дефосфорилированные производные [(A2'p)₂A, (2'-5')A₃, 2-5А-кор], участвуют в различных биохимических процессах животных клеток, включая противовирусное действие IFN [8]. Действительно, сообщалось, что олигоаденилаты с 2'-5'-связью могут имитировать многие эффекты действия интерферона на клетки. Например, 2-5А [9], а также (2'-5')A₃ и его 3'-дезоксидеоксиаденозиновый (кордицепин, 3'dA) аналог, (2'-5')(3'dA)₃ [10] увеличивают, аналогично IFN, литическую активность НК-клеток при оптимальной 50 мкМ концентрации, таким образом имитируя действие IFN. Изучение действия (2'-5')A₃ и (2'-5')(3'dA)₃ на НК-лимфоциты показало, что повышение активности НК-клеток характерно только для олигомеров с 2'-5'-фосфодиэфирной связью. Тример (3'-5')олигоадениловой кислоты, (3'-5')A₃, не оказывал влияния на литическую активность НК-клеток даже при концентрации в

Сокращения: 2-5А – 5'-трифосфо[аденилил(2'-5')]_nаденозин, 1 < n < 6, главным образом тример, n = 2; 2-5А-кор, (2'-5')A_n – [аденилил(2'-5')]_nаденозин; (2'-5')(3'dA)₃ – 3'-дезоксидеоксиаденилил(2'-5')-3'-дезоксидеоксиаденилил(2'-5')-3'-дезоксидеоксиаденозин; A^F – 9-(3-дезоксидеокси-3-фтор-β-D-ксилофуранозил)аденин; A_F – 3'-дезоксидеокси-3'-фтораденозин; НК-клетки, НК-лимфоциты – клетки естественных киллеров человека; IFN – интерферон; ПКЛ – периферической крови лимфоциты; DTPA – диэтилентриаминопентауксусная кислота.

* Автор для переписки (тел./факс: (0172) 648-324; e-mail: igormikh@ns.iboch.ac.by).

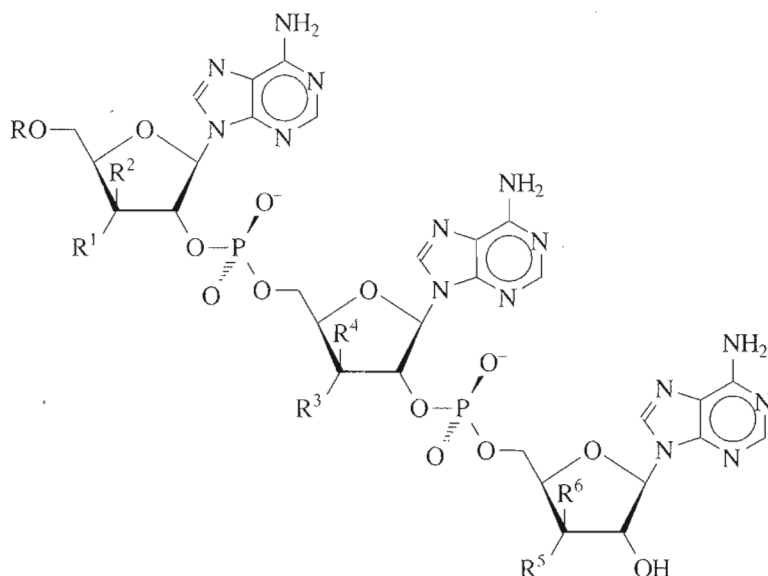


Схема.

(2'-5') Олигомер	R	R ¹	R ²	R ³	R ⁴	R ⁵	R ⁶
2-5А	P ₃ O ₉ H ₂	ОН	Н	ОН	Н	ОН	Н
2-5А-кор, А ₃	Н	ОН	Н	ОН	Н	ОН	Н
(3'dA) ₃	Н	Н	Н	Н	Н	Н	Н
(A ^F)A ₂	Н	Н	F	ОН	Н	ОН	Н
A(A ^F)A	Н	ОН	Н	Н	F	ОН	Н
A ₂ (A ^F)	Н	ОН	Н	ОН	Н	Н	F
(A _F)A ₂	Н	F	Н	ОН	Н	ОН	Н
A(A _F)A	Н	ОН	Н	F	Н	ОН	Н
A ₂ (A _F)	Н	ОН	Н	ОН	Н	F	Н
A(A ^F)(A _F)	Н	ОН	Н	Н	F	F	Н

300 мкМ [10]. Аденозин и 3'-дезоксаденозин в концентрации 150 мкМ также не влияли на активность НК-клеток, что исключает действие (2'-5')тримеров в качестве депо-форм нуклеозидов. Авторы предполагают, что стереохимия 3'-5'- и 2'-5'-фосфодиэфирных связей обуславливает различия во влиянии этих олигомеров на литическую активность НК-лимфоцитов.

Ранее мы сообщали о синтезе и детальном конформационном анализе двух типов аналогов 2-5А-коровых тримеров, содержащих конформационно жесткие 9-(3-дезокси-3-фтор-β-D-ксилофуранозил)аденин (A^F) и 3'-дезокси-3'-фторадеинозин (A_F) в различных положениях цепи тримера [11–13]. Было установлено, что атом фтора решающим образом влияет на конформацию фуранозного кольца, что приводит к существенным различиям в пространственной организации этих тримеров [12]. Нами было также показано, что стереохимия тримеров играет важную роль в ряде биохимических процессов, например, в связывании и активации 2-5А-зависимой эндорибонуклеазы (РНКаза L) [11, 13]. В свете этих данных одинаковая активность (2'-5')A₃ и (2'-5')(3'dA)₃ в отношении НК-клеток представляется неожиданной. Действительно, оба тримера существенно различаются по своей пространственной структуре [12, 14], при этом природный тример – конформационно подвижная молекула, тогда как в случае (2'-5')(3'dA)₃ преимущественно заселена одна из пространственных структур. По-видимому, молекула (2'-5')(3'dA)₃ не является с термодинамической точки зрения значительно более жесткой в сравнении с природным тримером, (2'-5')A₃, и при взаимодействии с НК-клетками способна принять пространственную организацию, подобную организации природного тримера. Примечательно,

что 3'-гидроксильная группа не принимает участия в процессе увеличения литической активности НК-клеток. По этой причине 3'-фтордезоксиналоги (2'-5')A₃ представляются уникальным инструментом для изучения стереохимических аспектов активации НК-клеток. Действительно, замена 3'-гидроксильной группы на атом фтора не создает каких-либо стерических затруднений. С другой стороны, 3'-фтордезоксиналоги являются конформационно жесткими молекулами, при этом наиболее заселенная пространственная структура аналога определяется как местонахождением атома фтора, так и его конфигурацией [12]. Последнее означает, что стереохимия пары изомеров, содержащих атом фтора в аналогичной позиции цепи, но в *рибо*- или *ксило*-конфигурации, существенно различается. Принимая во внимание эти предпосылки, в настоящей работе изучено влияние стереохимии *ксило*- и *рибо*-3'-фтордезоксиналогов корового тримера (2',5')олигоадениловой кислоты на цитотоксическую активность НК-клеток человека.

Для оценки степени влияния 3'-фтордезоксиналогов на увеличение литической активности НК-клеток были использованы три различных метода: (а) определение цитотоксической активности при различных соотношениях НК-клеток (Е) и клеток-мишеней (Т) (рис. 1); (б) расчет значений литической активности (табл. 1); и (в) кинетический метод изучения клеточной цитотоксичности, основанный на кинетике Михаэлиса–Ментен [15] (табл. 2). Первый метод позволяет установить литическое действие НК-лимфоцитов, а также влияние олигоаденилатов на этот процесс. Величины литической активности, выраженной в литических единицах, дают возможность сравнивать цитотоксическую активность

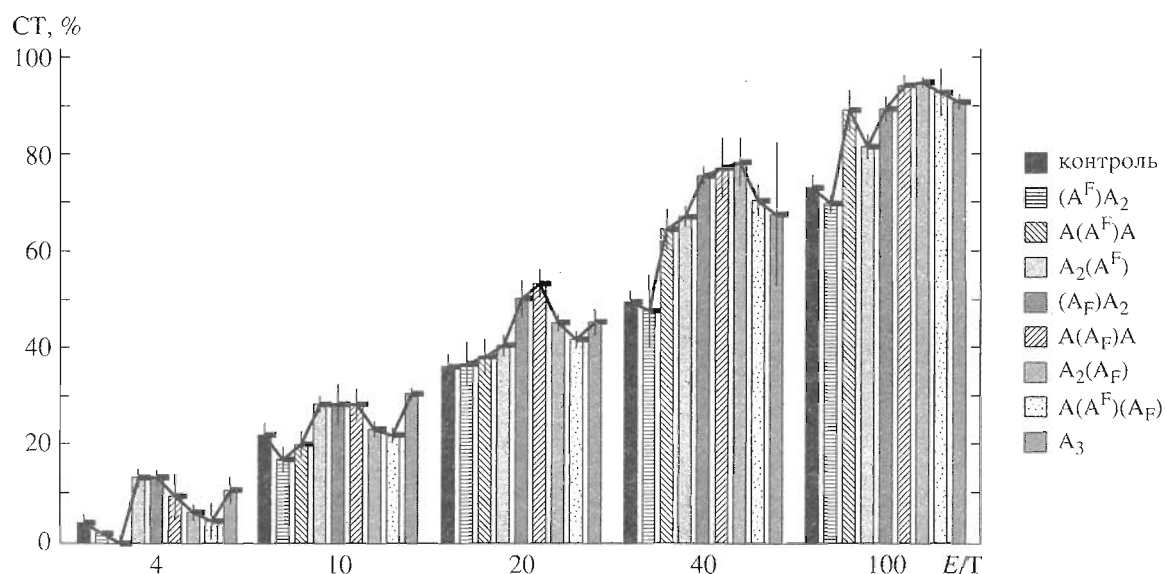


Рис. 1. Влияние 3'-фтордезоксиналогов (2'-5') A_3 на литическую активность НК-лимфоцитов при различных соотношениях эффекторных клеток к клеткам-мишеням (средние значения цитотоксичности (СТ, %) и стандартные отклонения были вычислены согласно работе [15]; эксперименты выполнены в 4-кратном повторе). Е и Т – число клеток-киллеров (НК-клеток) и клеток мишеней.

НК-лимфоцитов из различных источников и/или экспериментов. Наконец, кинетический анализ позволяет количественно оценить литическую активность НК-лимфоцитов. В настоящей работе кинетический анализ был проведен по методу [15, 16], в котором в результате детального рассмотрения процесса лизиса было установлено, что кажущаяся константа Михаэлиса, K_m^{app} , соответствует числу лимфоцитов, являющихся эффекторными клетками по отношению к изучаемым клеткам-мишеням (они составляют лишь небольшую долю от общего числа лимфоцитов в эксперименте). Вторая, экспериментально определяемая величина, V_{max} , характеризует количество лизированных за 1 ч клеток-мишеней.

Клеточная цитотоксичность была определена высокочувствительным методом [18, 19]. В каче-

стве клеток-мишеней использовались клетки эритролейкемии К 562, которые метились нерадиоактивным хелатным комплексом Eu-DTPA. Как было показано, Eu-DTPA не изменял морфологию и характеристики клеток-мишеней.

Влияние 3'-дезоксидеокси-3'-фтораналогов (2'-5') A_3 на НК-лимфоциты было изучено при 0, 25 и 37°C в течение 0.5, 1.0, 1.5 и 2.0 ч. Литическая активность НК-лимфоцитов была максимальной при обработке клеток фтордезоксиналогами в течение 1.5 ч при 37°C. Для выбора оптимальных условий проведения эксперимента были изучены 10-, 20- и 50-мкМ концентрации олигоаденилатов. Наиболее эффективной была 50-мкМ концентрация олигомера, которая и использовалась в последующих экспериментах. Применение высокочувствительного, по сравнению с радиомет-

Таблица 1. Влияние 3'-фтордезоксиналогов (2'-5') A_3 на литическую активность (LA)* НК-лимфоцитов

(2'-5') Олигомер	LA, LE ₂₀	Увеличение LA, %	LA, LE ₃₀	Увеличение LA, %	LA, LE ₅₀	Увеличение LA, %
Контроль	11.0	0	7.1	0	2.0	0
A_3	16.2	47	10.0	41	4.5	125
$(A^F)A_2$	8.0	-27	6.7	-5.6	2.0	0
$A(A^F)A$	10.0	-9	7.1	0	3.8	90
$A_2(A^F)$	16.0	46	9.4	32	4.2	108
$(A_F)A_2$	16.6	51	10.0	41	5.0	150
$A(A_F)A$	14.3	30	10.0	41	5.5	175
$A_2(A_F)$	11.5	4.5	8.3	17	4.5	125
$A(A^F)(A_F)$	12.2	11	8.0	13	4.3	115

* Определение литической активности и литических единиц см. "Эксперимент. часть".

рическим (^{51}Cr), Eu-DTPA-метода позволило установить, что при 20-мкМ концентрации тримеров наблюдается их влияние на процесс лизиса (ср. с данными работы [10]). Способность 3'-фтордезоксиналогов двух типов (*ксило-* и *рибо-*), а также бисзамещенного тримера увеличивать литическую активность НК-клеток была изучена в сравнении с природным тримером (2'-5') A_3 . Результаты представлены на рис. 1.

Чтобы учесть возможное влияние нуклеозидов на активацию НК-клеток, с эффекторными клетками в аналогичных условиях инкубировали аденозин и фтордезоксинуклеозиды A^{F} или A_{F} в концентрации 150 мкМ. Однако при этом никакого повышения литической активности не наблюдалось (рис. 2).

Как было отмечено выше, природный коровый тример, (2'-5') A_3 , и его кордицепиновый аналог, (2'-5')(3'd A_3), повышают активность НК-клеток [10]. Обработка НК-лимфоцитов 3'-дезоксиз-3'-фтораналогами природного (2'-5') A_3 приводит, как правило, к заметному увеличению активности НК-лимфоцитов при различных соотношениях эффекторных клеток и клеток-мишеней (E/T) (рис. 1). Более того, мы нашли, что степень увеличения активности НК-клеток существенно различается для разных фтордезоксиналогов и зависит как от конфигурации атома фтора, A^{F} или A_{F} , так и от положения модифицированного нуклеозида в цепи тримера (рис. 1, табл. 1). Наиболее неожиданным было поведение *ксило-*аналога, (2'-5')(A^{F}) A_2 , у которого 5'-терминальный аденозин в (2'-5') A_3 был замещен на ксилонид A^{F} . Как следует из значений LE_{20} и LE_{30} , аналог (2'-5')(A^{F}) A_2 инактивирует эффекторные НК-клетки на 27 и 5.6%, соответственно, и не оказывает какого-либо заметного эффекта на литическую активность при увеличении количества эффекторных клеток (E) по отношению к клеткам-мишеням (T) (см. величины LE_{50}). В то же время, изомерный *рибо-*аналог, (2'-5')(A_{F}) A_2 , повышает активность НК-клеток при всех соотношениях числа лимфоцитов и клеток-мишеней (E/T). Замещение центрального аденозинового фрагмента на ксилонид A^{F} давало тример (2'-5') $\text{A}(\text{A}^{\text{F}})\text{A}$, который также оказывал инактивирующий эффект на НК-клетки, хотя и не такой сильный, как в случае (2'-5')(A^{F}) A_2 . Напротив, изомерный *рибо-*аналог, (2'-5') $\text{A}(\text{A}_{\text{F}})\text{A}$, повышал активность НК-клеток (сравни значения LE_{20} и LE_{30}) также, как природный тример (2'-5') A_3 , а при увеличении соотношения эффекторных клеток к клеткам-мишеням (E/T) был даже на 40% более эффективен (см. значения LE_{50}). Активирующая способность *ксило-*аналога, (2'-5') $\text{A}_2(\text{A}^{\text{F}})$, была сравнима с действи-

Таблица 2. Кинетический анализ влияния 3'-фтордезоксиналогов (2'-5') A_3 на цитотоксическую активность НК-лимфоцитов*

Обработка	$V_{\text{макс}} \times 10^{-3}$	$K_m^{\text{app}} \times 10^{-3}$	NK, %	$k_2 (\times 10^2)$
Контроль	14.3	30.0	3.0	47.7
(A^{F}) A_2	10.0	17.5	1.75	57.1
$\text{A}(\text{A}^{\text{F}})\text{A}$	12.7	15.0	1.5	84.7
$\text{A}_2(\text{A}^{\text{F}})$	19.6	32.3	3.2	60.7
(A_{F}) A_2	19.4	30.0	3.0	64.7
$\text{A}(\text{A}_{\text{F}})\text{A}$	20.0	30.0	3.0	66.7
$\text{A}_2(\text{A}_{\text{F}})$	17.9	25.0	2.5	71.6
$\text{A}(\text{A}_{\text{F}})(\text{A}_{\text{F}})$	13.7	18.5	1.85	74.1
A_3	17.6	29.0	2.9	60.7

* $V_{\text{макс}}$ – максимальная скорость лизиса, соответствующая числу клеток-мишеней, лизируемых за 1 ч; K_m^{app} – кажущаяся константа Михаэлиса, соответствует числу действующих НК-клеток на ячейку; $\text{NK} = K_m^{\text{app}} / [\text{ПКЛ}]$; k_2 – константа скорости лизиса, характеризующая количество клеток-мишеней, лизируемых за 1 ч индивидуальной действующей НК-клеткой ($V_{\text{макс}} / K_m^{\text{app}}$).

ем природного тримера, (2'-5') A_3 при всех изученных значениях E/T. В противоположность этому, НК-лимфоцитная активность *рибо-*аналога, (2'-5') $\text{A}_2(\text{A}_{\text{F}})$, обнаруживала сильную зависимость от соотношения числа естественных киллеров и клеток-мишеней. Наконец, активность бисзамещенного аналога, (2'-5') $\text{A}(\text{A}^{\text{F}})\text{A}_{\text{F}}$ довольно хорошо соответствует совокупности свойств родственных монозамещенных аналогов. Эти результаты свидетельствуют о том, что стереохимия тримеров играет важную роль в их способности увеличивать литическую активность НК-лимфоцитов.

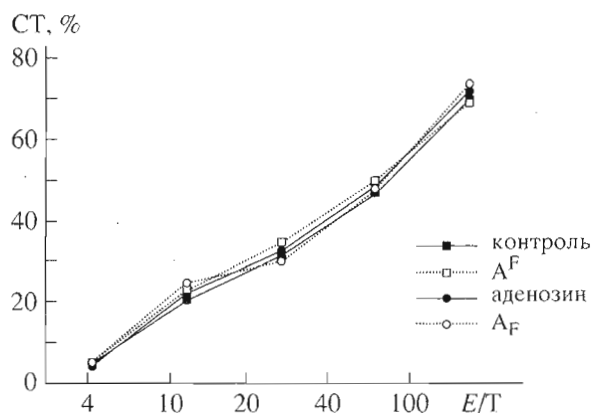


Рис. 2. Влияние аденозина, 9-(3-дезоксиз-3-фтор- β -D-ксилофуранозил)аденина (A^{F}) и 3'-дезоксиз-3'-фтораденозина (A_{F}) на литическую активность НК-лимфоцитов при различных соотношениях числа эффекторных клеток и клеток-мишеней (эксперименты выполнены в 4-кратном повторе).

Более детальный анализ влияния фтордезоксисаналогов на активность НК-клеток был сделан сравнением кинетических параметров K_m^{app} и V_{max} , а также значений констант скорости лизиса k_2 (табл. 2). Прежде всего, следует отметить, что полученные значения k_2 указывают на способность всех изученных аналогов так же, как и природного тримера $(2'-5')A_3$, повышать литическую активность действующих эффекторных НК-клеток. По всей вероятности, различия в значениях k_2 отражают различия в пространственной организации тримеров. Обработка НК-клеток олигоаденилатами, в которых 5'-терминальный или центральный аденозиновый фрагмент замещен на *ксилонуклеозид*, A^F , а именно, $(2'-5')(A^F)A_2$, $(2'-5')A(A^F)A$ и $(2'-5')A(A^F)(A_F)$, вызывала значительное уменьшение числа действующих НК-клеток (см. значения K_m^{app}), что приводило к подавлению литической активности в сравнении с природным тримером (ср. соответствующие значения V_{max}). Однако уменьшение числа действующих эффекторных НК-лимфоцитов и уменьшение максимальной скорости лизиса не были адекватны. Обработка НК-клеток вышеуказанными олигомерами приводит к повышению литической активности индивидуальной эффекторной клетки, что отражается на величинах значений констант скорости лизиса, k_2 .

Олигомеры, содержащие A^F и A_F в аналогичной кордицепиновому аналогу позиции цепи тримера, структурно ему подобны. В то же время, атом фтора решающим образом влияет на конформацию фуранозного кольца: в случае A^F фуранозный фрагмент находится в *N*-конформации и значительно уплощен; напротив, A_F обнаруживает практически чистую *S*-конформацию [12]. Это обуславливает различную пространственную организацию 3'-дезоксигуанозин-3'-фторолигоаденилатов. Так, стереохимия тримеров $(2'-5')(A^F)A_2$ и $(2'-5')A(A^F)A$ определяется преимущественным заселением *N*-конформации фуранозного кольца и *син*-ориентацией гетероциклического основания относительно гликозидной связи A^F -фрагмента, тогда как соответствующие *рибо*-изомеры $(2'-5')(A_F)A_2$ и $(2'-5')A(A_F)A$, подобно природному тримеру $(2'-5')A_3$, имеют *анти*-конформацию всех гетерооснований и жесткую *S*-конформацию фуранозного кольца A_F . Следует отметить, что стереохимические особенности 5'-трифосфата $(2'-5')(A^F)A_2$ рассматриваются в качестве основного фактора, определяющего его более высокую в сравнении с 2-5A способность активировать РНКазу L [12, 13]. Аналогичным образом можно предполагать, что конформационные особенности $(2'-5')(A^F)A_2$, $(2'-5')A(A^F)A$ и $(2'-5')A(A^F)(A_F)$, по

сравнению с природным тримером, ответственны за наблюдаемое влияние на литическую активность НК-клеток.

В случае *рибо*-аналогов, содержащих A_F в 5'-терминальном или центральном положении цепи, $(2'-5')(A_F)A_2$ и $(2'-5')A(A_F)A$, число действующих НК-лимфоцитов было аналогичным контролю, а также природному тримеру, $(2'-5')A_3$, однако скорости лизиса (как V_{max} , так и k_2) существенно отличались в обоих случаях. По-видимому, некоторые различия в пространственной структуре этих тримеров, обусловленные жесткой *S*-конформацией фуранозного кольца A_F , как раз и приводят к наблюдаемым эффектам. Поведение изомерной пары *ксило*- и *рибо*-3'-дезоксигуанозин-3'-фтораналогов $(2'-5')A_2(A^F)$ и $(2'-5')A_2(A_F)$ удовлетворительно коррелирует с поведением природного тримера, $(2'-5')A_3$. Эти данные позволяют предположить, что стереохимические различия 2'(3')-терминального фрагмента этих трех соединений не влияют на процесс стимуляции ими естественных киллеров.

В заключение следует отметить, что использование конформационно модифицированных 3'-фтордезоксисаналогов корового тримера 2-5A позволяет оценить роль стереохимии эффекторов в их способности влиять на литическую активность НК-лимфоцитов человека. Результаты данного исследования убедительно показывают, что именно пространственная организация 3'-фтордезоксигуанозин-3'-фторолигоаденилатов – один из основных факторов, определяющих влияние $(2'-5')$ олигоаденилатов на НК-клетки. Кинетический анализ показал, что замещение центрального аденозинового фрагмента или, в большей степени, 5'-терминального аденозинового остатка $(2'-5')A_3$ на A^F приводит к существенному уменьшению литической активности НК-клеток, в то время как модификация 2'(3')-конца вызывает такое же или более значительное увеличение литической активности НК-лимфоцитов, как и природный тример. Несомненно, поиск подходов к направленному регулированию природной защитной функции организма с помощью аналогов корового тримера 2-5A может привести к обнаружению соединений с высоким терапевтическим потенциалом.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Синтез 9-(3-дезоксигуанозин-3'-фтор-β-D-ксилонуклеозид)аденина (A^F) [13] и 3'-дезоксигуанозин-3'-фтораденина (A_F) проводили по методикам [20, 21]. $(2'-5')$ Олигоаденилаты получали как описано в наших предыдущих публикациях с использованием фосфотриэфирной методологии [13, 22]. Олигонуклеотиды выделяли как аморфные Na^+ -соли согласно [23]. Для биохимических экспериментов

олигонуклеотиды очищали с использованием обращенно-фазовой ВЭЖХ как описано ранее [13]. Базовые растворы олигомеров (10 мМ) готовили в стерильной дистиллированной воде и затем разбавляли культуральной средой. Другие реактивы и материалы: аденозин (Sigma, США), сульфат декстрана (*M*, 500 000, Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala, Швеция), EuCl_3 (Aldrich, США), ДТРА (Sigma, США), дельфия, усиливающий раствор (Delfia™, Wallac Oy, Turku, Финляндия), флаконы для тканевых культур (Falcon 3024 F), пластиковые пробирки (Falcon 2095).

НК-лимфоциты выделяли из гепаринизированной цельной крови, полученной у здоровых взрослых доноров, в фикал-гепариновом градиенте (градиент плотности 1.077) согласно [24]. Кровь, разбавленную равным объемом стерильного солевого раствора, тщательно наслаивали на 25 мл фикал-гепаринового раствора в 50-мл стерильных центрифужных пробирках и центрифугировали 25 мин при 800 *g* при комнатной температуре. Клетки, осаждающиеся на поверхности между плазмой и фикал-гепариновым раствором, аккуратно собирали стерильной пипеткой Пастера и промывали 3 раза сбалансированным солевым раствором (рН 7.2). Полученную фракцию клеток (от 5×10^7 до 10×10^7 в 10–15 мл) инкубировали в течение 1 ч при 37°C в 75-мл флаконах для тканевых культур. Неприкрепленную фракцию клеток собирали и использовали далее при исследовании цитотоксической активности НК-клеток.

Обработка эффекторных клеток. Неприкрепленную фракцию клеток суспендировали в 1 мл среды Игла, модифицированной Дульбеко, содержащей 5% эмбриональной телячьей сыворотки, и добавляли 10 мкл раствора олигоаденилата соответствующей концентрации. Концентрация тримеров в среде обрабатываемых клеток составляла (10, 20 или 50 мкМ) и получалась в результате разведения базового раствора (10 мМ) культуральной средой в 2, 5 или 10 раз, соответственно, с последующим добавлением 10 мкл полученного раствора олигоаденилата к обрабатываемым клеткам. Клетки инкубировали 1.5 ч при 37°C, промывали средой, ресуспендировали в новой порции среды и разбавляли до необходимой концентрации.

Клетки-мишени. В качестве клеток-мишеней использовали эритролейкозные клетки человека К 562. Клеточную линию поддерживали в полной среде во флаконах для тканевых культур с заменой каждые вторые сутки половины среды.

Получение меченых Eu^{3+} клеток-мишеней. Клетки-мишени, меченные Eu -ДТРА, получали согласно описанному методу [18, 19]. Метку добавляли в стерильный буфер А, содержащий

50 мМ HEPES, 93 мМ NaCl, 5 мМ KCl и 2 мМ MgCl_2 (рН доведен до 7.4 NaOH). Буфер А, дополненный 20 мкМ EuCl_3 , 100 мкМ ДТРА (нейтрализован NaOH) и 500 мг/мл сульфата декстрана использовали для получения меченых Eu^{3+} клеток-мишеней. Сульфат декстрана добавляли непосредственно перед применением. Приблизительно 5×10^6 клеток-мишеней суспендировали в 1 мл меченого буфера в пластиковых пробирках (Falcon 2095) и инкубировали при 4°C в течение 15–20 мин. Во время инкубации клетки суспендировали пипеткой Пастера. За 5 мин до окончания инкубации добавляли 20 мкл 100 мМ раствора CaCl_2 . Полученные клетки пятикратно промывали буфером Б (буфер А, содержащий 3 мМ CaCl_2 и 10 мМ глюкозу). Для эксперимента клетки ресуспендировали в полной среде в концентрации 5×10^4 клеток/мл.

Определение цитотоксичности. 100 мкл (5×10^3 клеток) меченых клеток К 562 пипетировали в микроплаты с круглодонными лунками (Nunc, Roskilde, Denmark). Равные объемы (0.1 мл) различных концентраций эффекторных клеток (НК-клеток) нативных (для контроля) или обработанных олигоаденилатами пипетировали на клетки-мишени (Т) при отношении числа эффекторных клеток к числу клеток-мишеней (Е/Т) в интервале от 4 : 1 до 100 : 1. Микроплаты инкубировали 2 ч в атмосфере 5% CO_2 при 37°C и затем центрифугировали 5 мин при 500 *g* [19, 20]. Спонтанный выход Eu^{3+} определяли инкубированием клеток-мишеней в полной среде, а максимальный выход – лизисом клеток-мишеней с 0.1 мл детергента (1% Тритон X-100). Спонтанный выход Eu -ДТРА составлял $6 \pm 2\%$ через 2 ч после инкубации; максимальный выход был близок к 100% от общего включения.

Флуоресценцию определяли на флуориметре (Arcus 1230, LKB-Wallac, Turku, Финляндия) после добавления 1 мкл раствора Delfia™ к 0.1 мл аликвоты супернатанта. Все эксперименты выполнены в 4-кратном повторе.

Расчет цитотоксической активности. Показателем деструкции клеток-мишеней является выход маркера (Eu^{3+}) в культуральную среду. Цитотоксическую активность НК-лимфоцитов (в процентах) вычисляли по формуле: $[(E - S)/(M - S)] \times 100$, где *E*, *S* и *M* – выход Eu -ДТРА в эксперименте, спонтанный и максимальный. Средние значения и стандартные отклонения были вычислены и статистически проанализированы согласно работе [15].

Расчет литической активности. Литическую активность различных групп эффекторных клеток сравнивали на основе числа литических единиц (LE) в расчете на 10^6 ПКЛ [15]. Одна литическая единица принималась равной числу эффектор-

ных клеток (естественных киллеров), лизирующих 20 (LE₂₀), 30 (LE₃₀) и 50% (LE₅₀) клеток-мишеней за время эксперимента. Повышение литической активности НК-клеток (в процентах) вычисляли по формуле: $\{[(LE \text{ на } 10^6 \text{ обработанных клеток/LE на } 10^6 \text{ контрольных клеток}) - 1] \times 100\}$.

Расчет кинетических параметров. Цитотоксическая активность для расчета кинетических параметров определялась при постоянном значении НК-лимфоцитов (1×10^6) и увеличивающейся концентрации Eu³⁺-меченых клеток-мишеней (1×10^4 , 2.5×10^4 , 5×10^4 , 10×10^4). В остальных условиях эксперимента соответствовали методике определения цитотоксичности.

Кинетические параметры клеточной цитотоксичности НК-лимфоцитов рассчитывали согласно данным работы [15]. Максимальную литическую скорость, $V_{\text{макс}}$, кажущуюся константу Михаэлиса, K_m^{app} , вычисляли из графика линеаризацией уравнения Михаэлиса–Ментен по методу Хейнса в координатах $([T]/V, [T])$ [15, 17], где $[T]$ – концентрация клеток-мишеней; $V = \frac{(E - S)[T]}{(M - S)t}$ – скорость

лизиса клеток-мишеней; значение E , S и M см. выше, t – продолжительность эксперимента (в часах). Наклон полученной прямой равен $1/V_{\text{макс}}$; отрезки, отсекаемые на оси ординат и абсцисс, равны $(K_m/V_{\text{макс}})$ и $(-K_m)$ соответственно [17]. Долю лимфоцитов, являющихся эффекторными клетками в отношении исследуемых клеток-мишеней, рассчитывали по формуле: $\text{НК} = K_m^{\text{app}}/[\text{ПКЛ}]$. Значения константы скорости лизиса, k_2 , отражающей число клеток-мишеней, лизируемых за 1 ч индивидуальной эффекторной НК-клеткой, определяли по формуле: $k_2 = V_{\text{макс}}/K_m^{\text{app}}$ [16].

Авторы благодарны проф. Д.И. Метелице (Институт биоорганической химии Национальной Академии наук Беларуси) за внимание к их работе и помощь при ее выполнении. И.А. Михайлопуло считает своим приятным долгом выразить благодарность Фонду им. А. фон Гумбольдта (г. Бонн/Бан-Годесберг, Германия) за частичную финансовую поддержку настоящего исследования.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Herberman R.B. // Natural Cell Mediated Immunity Against Tumors / Ed. R.B. Herberman. N.Y.: Acad. Press, 1980.
- Herberman R.B., Ortaldo J.R. // Science. 1981. V. 214. P. 24–30.
- Herberman R.B., Ortaldo J.R., Timonen T. // Methods Enzymol. 1981. V. 79. P. 477–484.
- Lee S.H., Kelley S., Stebbing N. // Cancer Res. 1982. V. 42. P. 1312–1316.
- Reid L.M., Minato N., Grosser I., Holland J., Kadish A., Bloom B.R. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1981. V. 78. P. 1171–1182.
- Kerr I.M., Brown R.E. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1978. V. 75. P. 256–280.
- Torrence P.F. // Biological Response Modifiers. New Approaches to Disease Intervention / Ed. P.F. Torrence. Orlando: Acad. Press, 1985. P. 77–105.
- Charubala R., Pfeleiderer W. // Progress in Molecular and Subcellular Biology. V. 14 / Eds W.E.G. Mueller, H.C. Schroeder. Berlin; Heidelberg: Springer Verlag, 1994. P. 114–138.
- Liu X.-Y., Wen Y.-M., Hou Y.-D., Yao K., Lou Y.-C., Chen Z.-Q., Zheng H.-D., Ren W.-H., Lin T.-Z., Huang Z.-R., Wong D.-B. // The Biology of Interferon System / Ed. E. De Macyer. Amsterdam: Elsevier/North-Holland Biomedical Press, 1981. P. 115–117.
- Black P.L., Henderson E.E., Pfeleiderer W., Charubala R., Suhadolnik R.J. // J. Immunol. 1984. V. 135. P. 2773–2777.
- Kalinichenko E.N., Podkopaeva T.L., Kelve M., Saarma M., Mikhailopulo I.A. // Biochem. Biophys. Res. Commun. 1990. V. 167. P. 20–26.
- Boogaart van den J.E., Kalinichenko E.N., Podkopaeva T.L., Mikhailopulo I.A., Altona C. // Eur. J. Biochem. 1994. V. 221. P. 759–768.
- Kalinichenko E.N., Podkopaeva T.L., Poopeiko N.E., Kelve M., Saarma M., Mikhailopulo I.A., Boogaart van den J.E., Altona C. // Recl. Trav. Chim. Pays-Bas. 1995. V. 114. P. 43–50.
- Doornbos J., Charubala R., Pfeleiderer W., Altona C. // Nucl. Acids Res. 1983. V. 11. P. 4569–4582.
- Callewaert D.M., Smeekens S.P., Mahle N.H. // J. Immunol. Methods. 1982. V. 49. P. 25–37.
- Callewaert D.M., Genyea J., Mahle N.H., Dayner S., Korzeniewski C., Schult S. // Scand. J. Immunol. 1983. V. 17. P. 479–487.
- Keltemu T. Основы ферментативной кинетики: Пер. с англ. М.: Мир, 1990. С. 131–133.
- Blomberg K., Granberg Ch., Hemmila I., Lovgren T. // J. Immunol. Methods. 1986. V. 86. P. 225–229.
- Blomberg K., Granberg Ch., Hemmila I., Lovgren T. // J. Immunol. Methods. 1986. V. 92. P. 117–123.
- Mikhailopulo I.A., Pricota T.I., Poopeiko N.E., Sivets G.G., Kvasyuk E.I., Sviryaeva T.V., Savochkina L.P., Beabealashvilli R.S. // FEBS Letters. 1989. V. 250. P. 139–141.
- Mikhailopulo I.A., Poopeiko N.E., Pricota T.I., Sivets G.G., Kvasyuk E.I., Balzarini J., De Clercq E. // J. Med. Chem. 1991. V. 34. P. 2195–2202.
- Кваасюк Е.И., Кулак Т.И., Калиниченко Е.Н., Подкопаева Т.Л., Михайлопуло И.А., Пфляйдерер В. // Биоорганическая химия. 1985. Т. 11. С. 1227–1238.
- Moffatt J.G. // Can. J. Chem. 1964. V. 42. P. 599–604.
- Boyum A. // Scand. J. Clin. Lab. Invest. 1968. V. 21 (Suppl. 97). P. 77.

3'-Deoxy-3'-Fluoro Analogues of 2-5A Core Trimers: Their Effect on the Lytic Activity of Human NK Lymphocytes

E. N. Kalinichenko*, T. L. Podkopaeva*, M. Kelve**, M. Saarma**, and I. A. Mikhailopulo**

*Institute of Bioorganic Chemistry, Belorussian Academy of Sciences, ul. Kuprevicha 5/2, Minsk, 220141 Belarus

**Institute of Chemical Physics and Biophysics, Estonian Academy of Sciences, Tallinn 200026, Estonia

The effect of core trimers, (2'-5')-analogues of oligoadenylic acid containing 9-(3-deoxy-3-fluoro- β -D-xylofuranosyl)adenine (A^F) and 3'-deoxy-3'-fluoroadenosine (A_F) in various positions of the oligomer chain, on the lytic activity of human natural killer cells (NK cells) was studied in three different ways. The cellular cytotoxicity was determined using a highly sensitive nonradioactive approach employing a chelate europium–diethylenetriamino-pentaacetic acid complex (Eu-DTPA). It was shown that all fluorodeoxyanalogues enhance the lytic activity of intact NK lymphocytes, which follows from the lysis rate constant k_2 . At the same time, the substitution of either the central adenosine fragment or (to a greater extent) the 5'-terminal residue of (2'-5') A_3 with A^F causes a decrease in the number of active NK cells, which, unlike the case of the natural core trimer, leads to a loss of the capacity to increase the activity of NK. By contrast, isomeric *ribo*-analogues, (2'-5') $(A_F)A_2$ and (2'-5') $A(A_F)A$, and trimers with the 2'(3')-terminal nucleotide substituted by A^F or A_F increased the activity of NK cells with an effectiveness close to or higher than the natural trimer (2'-5') A_3 . Inasmuch as isomeric *xylo*- and *ribo*-3'-deoxy-3'-fluoroanalogues of (2'-5') A_3 are stereochemically modified oligomers, the data unambiguously suggest that the spatial structure of these trimers affects the increase in the lytic activity of NK cells.

Key words: 2-5A trimer, 3'-deoxy-3'-fluoroanalogues, NK cells, lytic activity, cytotoxicity, kinetics, nonradioactive (Eu^{3+}) approach

To whom correspondence should be addressed; phone/fax: +7 (0172) 648-324; e-mail: igormikh@ns.iboch.ac.by.