

7. Keilhoz U., Weber J., Finke J. H. et al. Immunologic monitoring of cancer vaccine therapy: Results of a workshop sponsored by the Society for Biological Therapy // J. Immunotherapy – 2002. – Vol. 25. – P. 97 – 138.
8. Marincola F. M., Jaffee E. M., Hicklin D. J. et al. Escape of human solid tumors from T cell recognition: molecular mechanisms and functional significance // Adv. Immunol. – 2000. – Vol. 74. – P. 181 – 273.
9. Mesa C., Fernandez L. E. Challenges facing adjuvants for cancer immunotherapy // Immunol. cell. biol. – 2004. – V. 82, № 6. – P. 644 – 650.

### РЕЗЮМЕ

#### СКРИНІНГ АД'ЮВАНТІВ ОРГАНІЧНОЇ ТА НЕОРГАНІЧНОЇ ПРИРОДИ ДЛЯ КОНСТРУВАННЯ ПРОТИПУХЛИННИХ ВАКЦИН

Бабій О.П. \*, Грегирчак Н.М. \*, Лич І.В. \*, Шпак Є.Г. \*\*

\* Національний університет харчових технологій, Київ, Україна

\*\* Інститут експериментальної патології, онкології та радіобіології ім. Р.Є. Кавецького

На інтактних тваринах вивчали імуномодулюючу активність ксеногенних вакцин виготовлених на основі курячих ембріональних білків та ад'ювантів органічної та неорганічної природи. Встановлено, що найбільшим імунологічно активними ад'ювантами для створення ксеногенних протипухлинних вакцин є глікопротеїди *B. subtilis* В-7025 з М. М. 18,5 кДа та 70 кДа. Спектр імунологічних ефектів досліджуваних вакцин включав активуючий вплив на клітинні і гуморальні реакції адаптивного імунітету (активність ЦТЛ, специфічна цитотоксичність сироватки крові) та на реакції природної протипухлинної резистентності (цитотоксична активність Лф і Мф). Результати роботи являються основою для подальших досліджень впливу вакцини на гумо-

ральну ланку імунітету та можливості створення протипухлинних препаратів на основі даних глікопротеїдів та курячих ембріональних білків.

**Ключові слова:** ад'юванти, протипухлинні ауто-вакцини, пухлиноасоційовані антигени, карцинома легенів Левіса, проліферація, апоптоз.

### РЕЗЮМЕ

#### СКРИНІНГ АД'ЮВАНТОВ ОРГАНИЧЕСКОЙ И НЕОРГАНИЧЕСКОЙ ПРИРОДЫ ДЛЯ КОНСТРУИРОВАНИЯ ПРОТИВООПУХОЛЕВЫХ ВАКЦИН

Бабий А.П. \*, Грегирчак Н.М. \*, Лыч И.В. \*, Шпак Е.Г. \*\*

\* Национальный университет пищевых технологий, Киев, Украина

\*\* Институт экспериментальной патологии, онкологии и радиобиологии им. Р.Е. Кавецкого

На интактных животных изучали иммуномодулирующую активность ксеногенных вакцин, изготовленных на основе куриных эмбриональных белков и адъювантов органической и неорганической природы. Установлено, что наибольшим иммунологически активными адъювантом для создания ксеногенных противоопухолевых вакцин являются гликопротеиды *B. subtilis* В-7025 с М. М. 18,5 кДа и 70 кДа. Спектр иммунологических эффектов исследуемых вакцин включает активизирующее влияние на клеточные и гуморальные реакции адаптивного иммунитета (активность ЦТЛ, специфическая цитотоксичность сыворотки крови) и на реакции естественной противоопухолевой резистентности (цитотоксическое активностью Лф и Мф). Результаты работы являются основой для дальнейших исследований влияния вакцины на клеточное звено иммунитета и возможности создания противоопухолевых препаратов на основе данных гликопротеидов и куриных эмбриональных белков.

**Ключевые слова:** адъюванты, противоопухолевые вакцины, опухольассоциированные антигены, карцинома легких Левиса, пролиферация, апоптоз.

УДК: 612.017.1:616.61-002.3:616.611-002

#### ОСОБЛИВОСТІ ІЛ-2-ЗАЛЕЖНОЇ ЛАНКИ ІМУНІТЕТУ У ПАЦІЄНТІВ З ЗАХВОРЮВАННЯМ НИРОК (ПІЄЛО- ТА ГЛОМЕРУЛОНЕФРИТ)

ГАЙСЕНЮК Ф.З., ДРІЯНСЬКА В.Є., ПЕТРИНА О.П., ДРАННІК Г.М.<sup>1</sup>, ПОРОШИНА Т.В.<sup>1</sup>, КАЛІНІНА Н.А.<sup>1</sup>

ДУ «Інститут нефрології АМН України»; ДУ «Інститут урології АМН України»<sup>1</sup>

У теперішній час доведена важлива роль системи інтерлейкінів у розвитку імунної відповіді. Важливого значення набуває подальше вивчення функціональної активності клітин моноцитарно-макрофагального ряду, Т-хелперів, які продукують цитокіни. Відомо, що Т-хелпери 1 типу (Т-х 1) секретують ІЛ-2, γ-ІФ і ФНП та сприяють розвитку клітинної імунної

відповіді, Т-хелпери 2 типу (Т-х 2) продукують ІЛ-4, ІЛ-5, ІЛ-6 та впливають на гуморальну імунну відповідь, а Т-хелпери 3 типу (Т-х 3) являються імунорегуляторними клітинами і продукують такі важливі цитокіни як ІЛ-10 та ТФР [1, 3].

Активовані макрофаги не тільки представляють Т-лімфоцитам антигени, але й виділяють ІЛ-1, який у активованих Т-клітин збуджує синтез

та секрецію ІЛ-2, а також експресію рецепторів для цього лімфокіну. ІЛ-2 є дуже важливим лімфокіном для функціонування Т-хелперів і імунної відповіді, який разом зі специфічним антигеном призводить до активації та клональної експансії Т-лімфоцитів, стимулює цитотоксичні клітини, созрівання Т-регуляторних та ін. [4, 5].

Лікування може бути спрямоване не тільки на порушення взаємодії антигенів з антитілами та сенсibilізованими імунокомпетентними клітинами, гальмування продукції антитіл та зниження продукції Т-хелперів (це використовується в клініці), а й впливати на різні субпопуляції хелперів – Th1 або Th2, стимулюючи, або гальмуючи вироблення ними різного спектра цитокінів. Так, ряд імуносупресантів, н-д, кортикостероїди, циклоспорин, такролімус, здатні інгібувати продукцію ІЛ-2 антиген-активованими Т-клітинами, інші (сіролімус) блокують ІЛ-2Р-взаємодію [6].

У зв'язку з цим, нами була поставлена задача вивчення показників ІЛ-2-залежної ланки імунітету у хворих на хвороби нирок - пієло- (ПН) та гломерулонефрит (ГН) - для виявлення їх ролі в імунопатогенезі та можливостей корекції.

#### МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ

Продукцію ІЛ-2 визначали у 79 хворих на ПН (64 – гострий і 15 хронічний) та 41 – хронічний ГН, контрольна група - 15 здорових донорів.

Експресію рецепторів до ІЛ-2 визначали за допомогою методу флуоресцентного аналізу, використовуючи моноклональні антитіла anti-IL-2R ("Becton Dickinson"). В 96-лункові планшети розкапували по 5 мкл вищеназваних антитіл, додавали по 30 мкл крові, ретельно перемішували за допомогою трусу 3 секунди та інкубували в темноті при кімнатній температурі 30 хвилин. Потім додавали 200 мкл лізуючого розчину та на протязі 8 хвилин тримали на холоді при 4

С. Після центрифугування надосадок вилучали, додавали 200 мкл буферного розчину з азідом натрію, перемішували та тричі відмивали буфером за допомогою центрифугування. Фіксували осадок параформальдегідом (2% параформ розбавляли 1:1 буфером та додавали 200 мкл в кожну лунку). Планшети зберігали в холодильнику при 4 С до тестування за допомогою цитофлуориметру фірми «Becton Dickinson».

Визначалась характеристика антигенів гістосумісності та аналізувалась частота зустрічаємості різних HLA-A, -B, -DR-антигенів у 90 хворих на гострий пієлонефрит в порівнянні із 120 здоровими.

#### РЕЗУЛЬТАТИ ТА ОБГОВОРЕННЯ

Аналіз показників хворих на гострий ПН залежно від характеру запального процесу показав, що спонтанна продукція ІЛ-2 у хворих з серозним запаленням у нирках достовірно вище, ніж у донорів - відповідно 41,8±4,1 та 12,9±1,1 пг/мл (р<0,001). Це свідчить про активацію імунної системи, зокрема, Т-хелперів 1 - головних продуцентів ІЛ-2. При дослідженні мітогеніндукованої секреції ІЛ-2 було встановлено, що у здорових донорів після стимуляції клітин за допомогою ФГА цей показник зростав у 6 разів, тоді як у хворих з гострим серозним пієлонефритом достовірних змін не виявлено (рис. 1).

Аналогічні дослідження в групі хворих на гнійний ПН також виявили достовірне підвищення спонтанної продукції ІЛ-2, але з тенденцією до зниження порівняно з серозним; мітогеніндукований рівень був достовірно нижче, ніж у здорових донорів (рис. 1); в порівнянні з спонтанною секрецією, не відбувалося посилення виробки цього лімфокіну при антигенній стимуляції, а у 60% пацієнтів спостерігалось зниження.

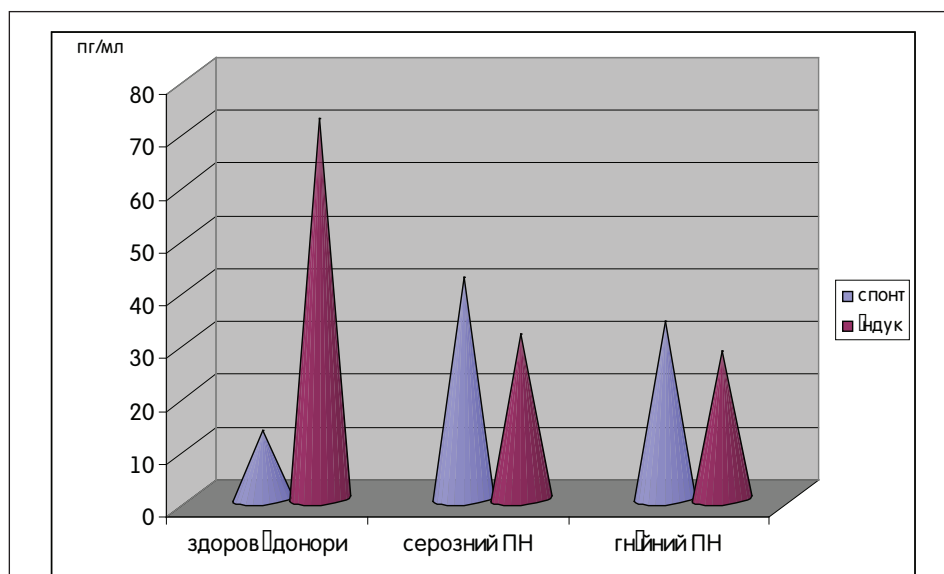
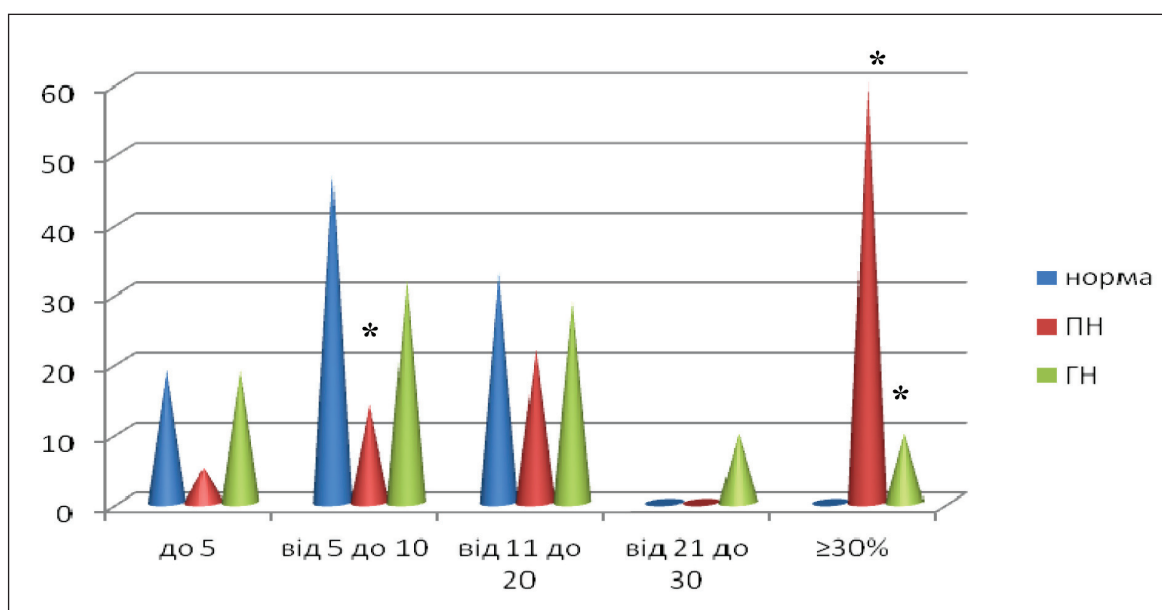


Рис. 1. Спонтанна (1) та мітогеніндукована (2) продукція ІЛ-2 у хворих на ПН та здорових донорів.

Таким чином, у пацієнтів з гострим ПН відбувається підвищення спонтанної продукції в порівнянні з нормою у здорових донорів, характерне як для серозного, так і гнійного пієлонефриту. Стимуляція клітин хворих за допомогою мітогену не призводила до підвищення продукції ІЛ-2, тоді як у здорових виявлено підвищення цього показника майже в 6 разів. У деяких хворих на гнійний ПН мало місце зниження стимульованої секреції лімфокіну в порівнянні з спонтанною, що свідчить про зниження резервних можливостей лімфоцитів в умовах гострого запалення.

Результати досліджень експресії рецепторів до лімфокіну показали значне підвищення числа клітин, що несуть ІЛ-2R, у хворих на ГП -  $32,6 \pm 2,5\%$  в порівнянні з нормою  $8,6 \pm 1,1\%$  ( $p < 0,001$ ).

Індивідуальний аналіз показав, що рівень ІЛ-2R+клітин в крові був вище 10% у 80% хворих на ПН та 33% здорових ( $p < 0,05$ ). Якщо половина показників здорових осіб знаходилась в інтервалі 5-10% і у жодного з них не було  $\geq 20\%$  ІЛ-2R+клітин, то в групі хворих у 60% спостерігались такі високі цифри ( $p < 0,05$ ) (рис. 2), а у деяких хворих на ПН число лімфоцитів з рецепторами до ІЛ-2 складало 45, 52 та 68%.



\* - різниця з нормою статистично достовірна

Рис. 2. Відносна кількість хворих на ПН, ГН та здорових донорів в залежності від рівню ІЛ-2R+клітин в периферичній крові.

Аналогічні дослідження в групі хворих з хронічним ПН (15 пацієнтів) показали, що число ІЛ-2R+клітин достовірно нижче, ніж при гострому процесі, та знаходиться на рівні здорових осіб: відповідно,  $6,7 \pm 1,1$  та  $8,6 \pm 1,1\%$  ( $p \geq 0,05$ ).

Якщо у хворих на ПН майже всі хворі мали високі показники ІЛ-2-залежної ланки імунітету, то при ГН середня продукція ІЛ-2 не відрізнялась від норми -  $12,7 \pm 1,2$  пг/мл ( $p > 0,05$ ), тоді як число ІЛ-2R+клітин достовірно підвищено -  $14,9 \pm 2,6\%$  ( $p < 0,05$ ), але розподіл по інтервалах рівномірний (рис. 2); існує кореляційний зв'язок між продукцією та експресією рецепторів до ІЛ-2 ( $R=0,789$ ,  $p < 0,001$ ). Аналіз показав, що при ХГН,

НС у 10 із 41 обстеженого (1 гр.) відмічався найбільш високий рівень як продукції, так і рівня рецепторів до цього лімфокіну. В цій групі середні продукція ІЛ-2 складає  $20,8 \pm 2,7$  в порівнянні з іншими пацієнтами (2 гр) -  $10,0 \pm 1,0$  ( $p < 0,001$ ) та нормою -  $12,9 \pm 1,1$  пг/мл ( $p < 0,05$ ), а число клітин з експресією ІЛ-2R -  $30,5 \pm 5,3$  в порівнянні з  $7,6 \pm 0,8$  в 2 гр. ( $p=0,002$ ) та  $8,6 \pm 1,0\%$  в нормі ( $p < 0,001$ ). Тобто в 2 гр. показники не відрізнялися від таких у здорових ( $p > 0,05$ ), а в 1 гр. були достовірно вище норми і хворих іншої групи за даними як продукції цитокіну, так і кількості клітин, що експресують рецептори до нього. Індивідуальний аналіз наданий на рис. 3 і 4.

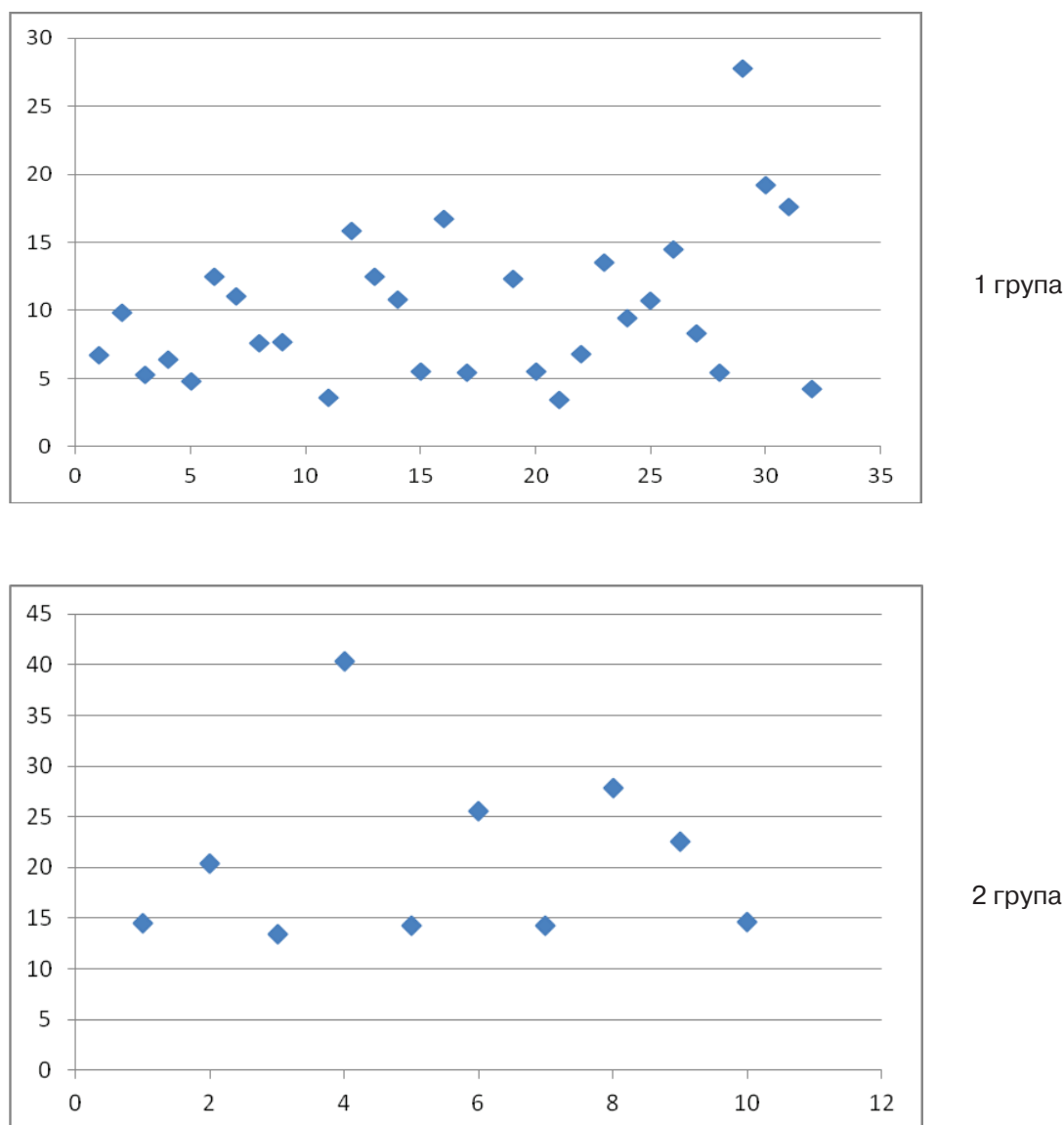


Рис. 3. Індивідуальний аналіз продукції ІЛ-2 клітинами хворих на ХГН, НС в групах з високою (1 гр) і більш низькою (2 гр) продукцією.

Співставлення показників у хворих показало більш високі рівні як продукції, так і експресії рецепторів до ІЛ-2 у хворих на гострий ПН порівняно як з хронічним ПН, так і ХГН, НС ( $p < 0,05$ ).

Аналіз асоціативних зв'язків ІЛ-2-залежної ланки та особливостей фенотипу у хворих на ГН показав, що у всіх пацієнтів 1 гр. (100%) виявлено наявність в фенотипі DR2 і у 60% - A10, тоді як в 2 гр. ці антигени виявлені, відповідно, у 38% та 42% ( $p < 0,05$ ). Таким чином, можна заключити, що висока активність Т-хелперів 1 по продукції ІЛ-2 та вираженість на мембрані клітин, що сприймають цей лімфокін, відповідних рецепторів асоціює з наявністю в фенотипі антигенів A10 та DR2.

Звертає увагу, що 1 група з високою продукцією ІЛ-2 та експресією рецепторів до нього складала менш ніж третину обстежених хворих,

у решти хворих показники не відрізнялись від норми. Але у пацієнтів з пієлонефритом, навпаки, майже всі хворі характеризувались високими показниками ІЛ-2-залежної ланки імунітету, тому асоціації цих показників з HLA-фенотипом не виявлені, але антиген A10 є антигеном-провокатором захворювання – зустрічається у 25% хворих в порівнянні з 13,5% у здорових донорів ( $RR=2,1$ ). Можна гадати, що A10, який частіше виявляється при ПН і асоціює з високою активністю Т-хелперів 1 по продукції ІЛ-2 та вираженою експресією рецепторів до нього, буде виступати предиктором задовільної імунної відповіді на патогенний чинник ГП та попереджувати негативний перебіг та хронізацію процесу в нирках, але підтвердження цим думкам можна здобути подальшими дослідженнями.

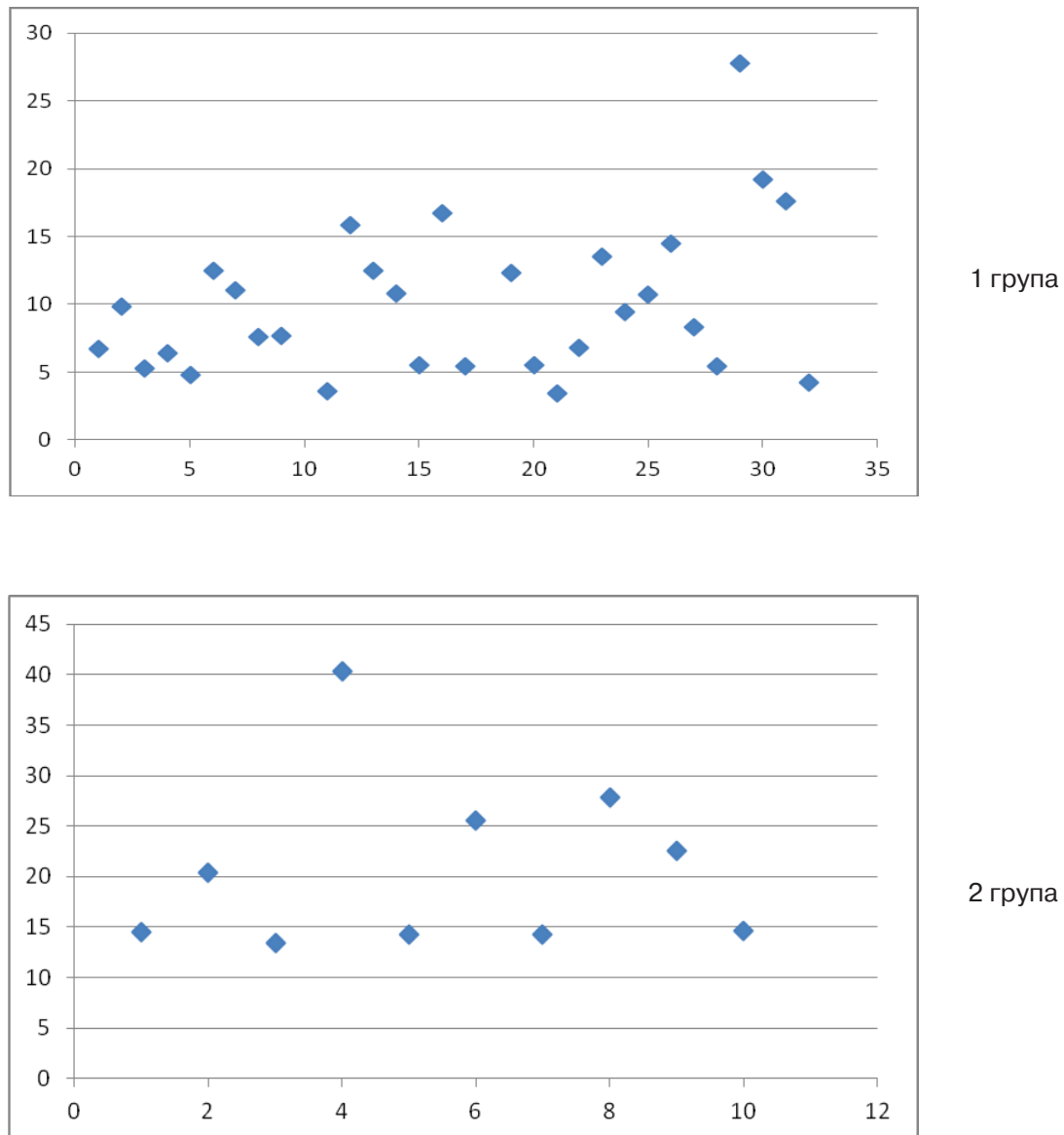


Рис. 4. Індивідуальний аналіз відносного числа ІЛ-2Р<sup>+</sup>-клітин у хворих на ХГН, НС в групах 1 і 2 .

### ВИСНОВКИ

Отримані дані дозволяють констатувати високу продукцію ІЛ-2 у хворих на ПН в порівнянні як з нормою, так і показниками при ХГН. На фоні активації функціональної активності Т-хелперів відбувається зниження їх резервних можливостей у хворих на гострий серозний пієлонефрит і відсутність резервів реагування у хворих з гнійним запальним процесом у нирках.

Дослідження свідчать про підвищення рівню експресії ІЛ-2Р<sup>+</sup>-клітин у хворих на гострий ПН, що може вказувати на компенсаторну реакцію імунної системи на недостатню індуковану продукцію ІЛ-2 в умовах антигенної стимуляції, а також на високий ступінь активності імункомпетентних клітин. В будь-якому випадку, у хворих на гострий ПН має місце висока готовність лім-

фоцитів до відповіді на ІЛ-2, що могло б сприяти позитивній реакції імунної системи на введення екзогенного ІЛ.

Розподіл популяції на основі типування HLA, можливо, дозволить передбачати, які варіанти терапії будуть найбільш ефективні для конкретних груп хворих. В цьому аспекті цікаві дослідження, які виявили асоціації імунодефіцитного стану з антигенами HLA-B5 та -DR5 [2]. Саме у осіб з фенотипом HLA-B5 та HLA-DR5 використання деяких імуномодуляторів *in vitro* ефективно відновлювало продукцію цитокінів та проліферативні реакції на мітогени, що дозволило авторам розцінювати наявність даних антигенів не тільки як свідчення підвищеної схильності до розвитку імунодефіциту, але й як основу для можливого призначення імуномодулюючих препаратів.

Встановлені асоціації між захворюваннями нирок (пієло- та гломерулонефрит) і антигенами HLA дозволять виявляти групи високого ризику та використовувати можливі превентивні терапевтичні заходи, а також більш активну терапію при виникненні захворювання для запобігання хронізації та втрати функції нирками.

### ЛІТЕРАТУРА

1. *Жданов А. В.* Особенности корреляционных связей в системе цитокинов / А. В. Жданов, Г. Т. Сухих, М. П. Давыдова // Бюл. Экспер. биол. и медицины. – 2003. – № 9. – С. 309-311.
2. *Певницкий Л.А., Баймуканова Г.К., Писарев В.М. и др.* Экологический иммунодефицит: иммуногенетические аспекты его развития и коррекции // Вестн. Российской АМН. - 1994. - №4. - С.20-27.
3. *Симбирцев А. С.* Цитокины – новая система регуляции защитных реакций организма / А. С. Симбирцев // Цитокины и воспаление. – 2002. - № 1. – С. 24-27.
4. *Beadling C. B.* DNA array analysis of interleukin-2-regulated immediate/early genes / C. B. Beadling, K. A. Smith // Med. Immunol. – 2002. - № 1 (1). – P. 1-2.
5. *Thornton A. M.* Cutting edge : IL-2 is critically required for the in vitro activation of CD4+CD25+ T cell suppressor function / A. M. Thornton, E. E. Donovan, C.A. Piccirillo, E.M. Shevach // J. Immunol. – 2004. - 172 (11). – P. 6519–6523.
6. *Waldmann T. A.* The biology of interleukin-2 and interleukin-15: implications for cancer therapy and vaccine design / T. A. Waldmann // Nature Rev. Immun. – 2006. - 6 (8) . – P. 595–601.

### РЕЗЮМЕ

#### ОСОБЛИВОСТІ ІЛ-2-ЗАЛЕЖНОЇ ЛАНКИ ІМУНІТЕТУ У ПАЦІЄНТІВ З ЗАХВОРЮВАННЯМ НИРОК (ПІЄЛО- ТА ГЛОМЕРУЛОНЕФРИТ)

*Гайсенюк Ф.З., Дріянська В.Є., Петрина О.П., Драннік Г.М.<sup>1</sup>, Порошина Т.В.<sup>1</sup>, Калініна Н.А.<sup>1</sup>*

ГУ «Інститут нефрології НАМНУ»;  
ГУ «Інститут урології НАМНУ»<sup>1</sup>

Исследованы особенности продукции ИЛ-2 и числа ИЛ-2Р+клеток у больных ПН и ГН. Показано, что для пациентов обеих групп характерно повышение уровня ИЛ-2Р+-лимфоцитов, а для больных с ПН – повышение спонтанной продукции ИЛ-2 при снижении митоген-индуцированной. Выявлены ассоциативные связи высоких показателей ИЛ-2-зависимого звена иммунитета и HLA-фенотипа (HLA-A10, DR2) при ХГН, НС.

**Ключевые слова:** ИЛ-2, ИЛ-2Р+-лимфоциты, пиелонефрит, гломерулонефрит, HLA.

### SUMMARY

#### PECULIARITIES OF THE IL-2-DEPENDENT IMMUNITY LINK IN PATIENTS WITH RENAL DISEASES (PYELO- AND GLOMERULONEPHRITIS)

*Gaysenyuk F.Z., Driyanska V.E., Petrina O.P., Drannik G.N.<sup>1</sup>, Poroshina T.V.<sup>1</sup>, Kalinina N.A.<sup>1</sup>*

Institute of Nephrology NAMSU; Institute of Urology NAMSU<sup>1</sup>

The peculiarities of the IL-2 production and the number of IL-2P+ cells in the PN and GN patients were analyzed. It was shown that the patients of both groups had the specific increase in the level of IL-2P+ lymphocytes but the PN patients had the increased spontaneous IL-2 production with the decrease in mytogen-induced one. The associated relations between the high levels of IL-2-dependent immunity link and HLA-phenotype (HLA-A10, DR2) in CGN and NS were found.

**Key words:** IL-2, IL-2P+-lymphocytes, pyelonephritis, glomerulonephritis, HLA.