

УДК 615.37:612.134-092.4/9

ВПЛИВ ІМУНОТРОПНИХ ПРЕПАРАТІВ НА ПРОДУКЦІЮ ЦИТОКІНІВ ЛІМФОЇДНИМИ КЛІТИНАМИ ПЕРИФЕРИЧНОЇ КРОВІ ЗДОРОВИХ ДОНОРІВ РІЗНОГО ВІКУ В УМОВАХ IN VITRO

САВЧЕНКО В.С.

ДУ «Інститут урології НАМН України»

На сьогодні з'явилося багато повідомлень про імуностимулюючий ефект нових синтетичних препаратів, засобів народної медицини, деяких харчових продуктів. Більшість імуномодуляторів мають добре вивчені механізми дії з переважним впливом на ту чи іншу ланку імунної системи, хоча, в залежності від різних умов, препарат може проявляти вплив і на інші її компоненти.

На жаль, традиційний механізм дії препаратів вивчають не приймаючи до уваги вік обстежених. Між тим, відомо, що імунна система, починаючи з 45-50 років старіє. Чи відображатиметься це на здатності лімфоцитів відповідати адекватною реакцією на імунотропні препарати? Подібних даних ми не зустрічали в доступній нам літературі. Все це вказує на необхідність попередньої оцінки параметрів імунної системи в кожному конкретному випадку з подальшим призначенням відповідного препарату чи відповідної його дози. В роботі поставлена мета дослідити в умовах *in vitro* імунотропні властивості препаратів Трансфер-фактор (фірма «4Life Research», США) та Ербісолу (фірма «Ербіс», Україна) та проаналізувати їх активність в залежності від віку донорів. Перший являється біологічно активною харчовою добавкою, а інший – фармпрепаратом. Трансфер-фактор, який виробляється компанією «4Life Research» (США) є гіпоалергенним продуктом, отриманим із молозива коров'ячого молока [3]. Він представляє собою концентрат природних пептидів, з молекулярною масою 1000-10.000 дальтон і довжиною до 50 амінокислотних залишків. Трансфер фактори представляють собою сукупність функціонально активних пептидів, які походять насамперед від цитокінів і надають загальний регуляторний вплив на клітини організму, перш за все на клітини імунної системи [4,5].

Фармпрепарат «Ербісол» представляє собою комплекс природних небілкових низькомолекулярних органічних сполук негормонального походження, отриманих із тваринної ембріональної тканини, містить глікопептиди, пептиди, нуклеотиди, амінокислоти [6].

В роботі вивчали здатність вищезазначених препаратів впливати та змінювати функціональну активність лімфоцитів периферичної крові здорових донорів різного віку та продукувати цитокіни ІЛ-12, α -ІФ, ІЛ-2, γ -ІФ, ІЛ-4, ІЛ-10, TGF- β .

Мета роботи: Вивчити в умовах *in vitro* функціональну активність дендритних клітин, Т-хелперів 1 та 2 типів, Т-регуляторних клітин здорових донорів за продукцією цитокінів під впливом препаратів та порівняти здатність мононуклеарних клітин донорів різного віку активуватися під впливом імунотропних препаратів.

МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

В дослідженні приймали участь 10 здорових донорів. Донори були розділені на 2 групи: I група молодшого віку – до неї ввійшло 6 донорів від 30-40 років; II група старшого віку – 4 донори від 50-70 років.

В цьому дослідженні для препаратів використовувалась концентрація, яка міститься в разовій дозі препарату в перерахунку на кількість клітин лімфоцитарно-моноцитарного ряду в 1 мл культурального середовища – $1,5 \times 10^6$ кл/мл.

Для Трансфер фактору – 1,38 мг в 20 мкл

Для Ербісолу – 20 мкл відповідали разовій дозі в 2 мл

Контролем виступала спонтанна продукція цитокінів без додавання препаратів.

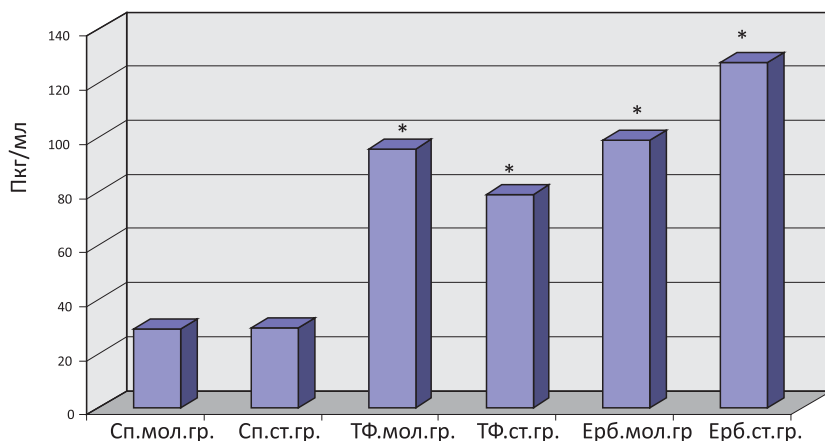
Визначення рівня цитокінів проводили імуноферментним методом за допомогою аналізатора Stat Fax 303 Plus (США). Для визначення вмісту цитокінів використовували тест системи «INVITROGEN» (США) для ІЛ12, ІЛ2; «Bender Medsystems» (США) для α -ІНФ, β -ІНФ; «Biosource» (США) для ІЛ-4, ІЛ-10 та «DRG» (Germany) для TGF- β .

Статистична обробка результатів проводилась на персональному комп'ютері за допомогою пакету програм «SPSS for Windows. Версія 11». Математична обробка отриманих результатів проводилась з врахуванням перевірки показників на нормальний розподіл за тестом Колмогорова-Смірнова. Для статистичної обробки використовувались параметричні критерії статистики - тест Ст'юдента, а також критерій Манна-Уїтні з поправкою Бонфероні. Обробка даних проводилась з допомогою програми Excel. Для порівняння двох залежних виборок використовували традиційний непараметричний тест Уїлкоксона. Достовірно вважали різницю при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕННЯ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

ІЛ-12 - один із важливих цитокінів, який продукується макрофагами, дендритними клітинами, від якого залежить форма специфічної імунної відповіді. В його присутності CD4+ Т-лімфоцити диференціюються у запальні Т-клітини хелпери 1 типу (Th1), які починають продукувати і секретувати ІЛ-2 і γ -ІНФ. Біоло-

гічні ефекти ІЛ-12 різноманітні: від підсилення проліферації лімфоцитів і потенціювання дії ІЛ-2 до активації натуральних кілерів і індукції диференціювання цитотоксичних лімфоцитів [2]. У зв'язку з цим дуже важливим було вивчення впливу на продукцію ІЛ-12 клітинами здорових донорів під впливом на них різних імунотропних препаратів в умовах *in vitro*. Отримані результати представлені на рис. 1.



* - різниця достовірна в порівнянні зі спонтанною продукцією;
Ербісол - $p < 0,001$; Трансфер-фактор - $p < 0,05$

Рис. 1. Продукція ІЛ-12 клітинами здорових донорів під впливом імунотропних препаратів

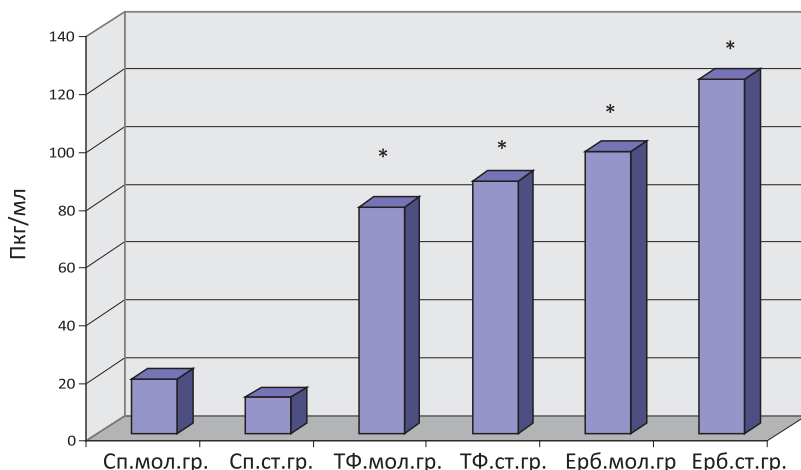
Як видно із рис. 1, впливу препарату Ербісол *in vitro* на функціональну активність клітин за продукцією ІЛ-12 показало, що препарат, викликає достовірне ($p < 0,001$) підвищення у молодшій та старшій групах ($99,0 \pm 29,3$ pg/ml та $127,6 \pm 12,1$ pg/ml, відповідно) секреції ІЛ-12 в порівнянні зі спонтанною продукцією (молодша група - $29,1 \pm 0,9$ pg/ml, старша група - $29,7 \pm 2,0$ pg/ml). Препарат Трансфер-фактор викликав достовірне підвищення продукції ІЛ-12 у обох групах. Культивування клітин периферичної крові донорів з Трансфер-фактором показало, що найбільша продукція ІЛ-12 спостерігалась у

молодшій групі і склала - $95,7 \pm 8,4$ pg/ml, у групі старшого віку спостерігалась нижча продукція цього цитокіну - $78,7 \pm 17,1$ pg/ml ($p < 0,05$).

Отже, найбільш активним продуцентом ІЛ-12 став препарат Ербісол особливо у групі старшого віку.

α -ІНФ являється одним із перших цитокінів, який продукується епітеліальними клітинами і клітинами вродженого імунітету на самих ранніх етапах розвитку імунітету [1].

Отримані результати дослідження продукції α -ІНФ клітинами здорових донорів під впливом імунотропних препаратів представлені на рис. 2



* - різниця достовірна в порівнянні зі спонтанною продукцією;
Ербісол - $p < 0,05$; Трансфер-фактор - $p < 0,001$

Рис. 2. Продукція α -ІНФ клітинами здорових донорів під впливом імунотропних препаратів

Як видно із рис. 2, вивчення спонтанної продукції α -ІНФ в молодшій групі в середньому показало результат $19,0 \pm 2,3$ pg/ml, у групі старшого віку – $12,5 \pm 0,6$ pg/ml. Підвищення продукції даного цитокіну виявлено під впливом препарату Трансфер-фактор у молодшій групі – $78,5 \pm 14,2$ pg/ml та у групі старшого віку – $87,3 \pm 11,2$ pg/ml ($p < 0,001$). Порівняльний аналіз показав, що максимальну продукцію α -ІНФ спостерігали в обох групах під впливом препарату Ербісол (молодша група – $97,7 \pm 15,9$ pg/ml та група старшого віку – $122,9 \pm 6,1$ pg/ml ($p < 0,05$)).

Таким чином, експерименти в умовах *in vitro* по продукції ІНФ- α показали, що препарат Ербісол проявив себе активніше в порівнянні з Трансфер-фактором, особливо у групі старшого віку.

Відомо, що функція ІЛ-2 (цитокін, який продукується Т-хелперами І типу) в міжклітинних взаємодіях заключається в тому, що він разом зі специфічним антигеном приводить до активації і клональної експансії антиген-специфічних Т-лімфоцитів [7]. Секреція ІЛ-2 активованими антигеном мононуклеарами приводить до активації багатьох типів клітин, утягуючи їх в імунну відповідь [2]. Порушення продукції і секреції в ІЛ-2-залежному ланцюгу приводять до дефектів функціонування Т- і В-лімфоцитів, макрофагів і натуральних кілерів. Ці дані, підкреслюють важливість вивчення можливого впливу різних імунотропних препаратів на продукцію клітинами ІЛ-2 в умовах *in vitro*.

Отримані результати функціональної активності Т-хелперів І типу за продукцією ІЛ-2 представлені на рис. 3.

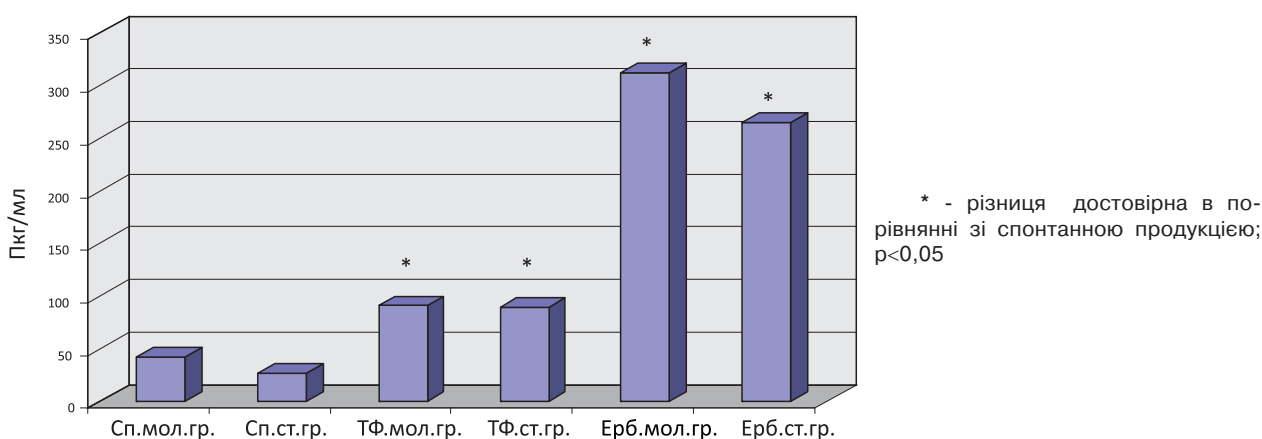


Рис. 3. Продукція ІЛ-2 клітинами здорових донорів під впливом досліджуваних препаратів

Як видно із рис. 3, показники спонтанної продукції ІЛ-2 клітинами здорових донорів в групі молодшого віку в середньому були – $41,8 \pm 5,0$ pg/ml; у групі старшого віку – $27,0 \pm 6,8$ pg/ml.

Максимально активним для обох груп виявився препарат Ербісол, продукція ІЛ-2 клітинами здорових донорів під впливом якого була у групі молодшого віку – $312,2 \pm 71,4$ pg/ml та у старшій групі – $264,8 \pm 37,0$ pg/ml ($p < 0,05$).

Препарат Трансфер-фактор виявився слабшим за фармацевтичний препарат Ербісол за продукцією ІЛ-2 (молодша група – $90,9 \pm 4,0$ pg/ml, старша група – $89,1 \pm 6,2$ pg/ml), але все ж достовірно підсилювали продукцію ІЛ-2 в порівнянні зі спонтанною ($p < 0,05$). Відомо, що підсилення інтерферонами цитотоксичності макрофагів оснований на тому, що γ -ІНФ являється індуктором NO-синтетази, фермента, який активує продукцію оксиду азота в макрофагах. Це неорганічний, газоподібний вільний радикал, який продукується в низьких дозах конститутивно, а у великих дозах – індукційно, різними типами клітин [1].

Отримані результати визначення функціональної активності Т-хелперів І типу за продукцією γ -ІНФ представлені на рис. 4

Як видно із рис. 4, дослідження клітин здорових донорів по продукції γ -ІНФ виявило, що показники спонтанної продукції у молодшій групі склали – $44,5 \pm 4,9$ pg/ml, у групі старшого віку – $43,8 \pm 7,3$ pg/ml.

Активність Трансфер-фактору виявилась максимальною у молодшій групі – $143,6 \pm 19,8$ pg/ml, у групі старшого віку продукція γ -ІНФ склали – $104,0 \pm 11,2$ pg/ml.

Інкубація клітин з препаратом Ербісол призводила до підвищення продукції γ -ІНФ до рівня $186,6 \pm 21,7$ pg/ml у групі молодшого віку та $139,8 \pm 39,0$ pg/ml у групі старшого віку ($p < 0,05$) у порівнянні зі спонтанною продукцією.

Як відомо, ІЛ-4 індуктує диференціювання попередників В-лімфоцитів, викликає проліферацію вже активованих В-клітин і експресію клітинних рецепторів до ІgЕ. Дія ІЛ-4 на ріст і диференціювання В-лімфоцитів опосередковано зв'язуванням ІЛ-4 зі специфічними рецепторами на їх поверхні [1].

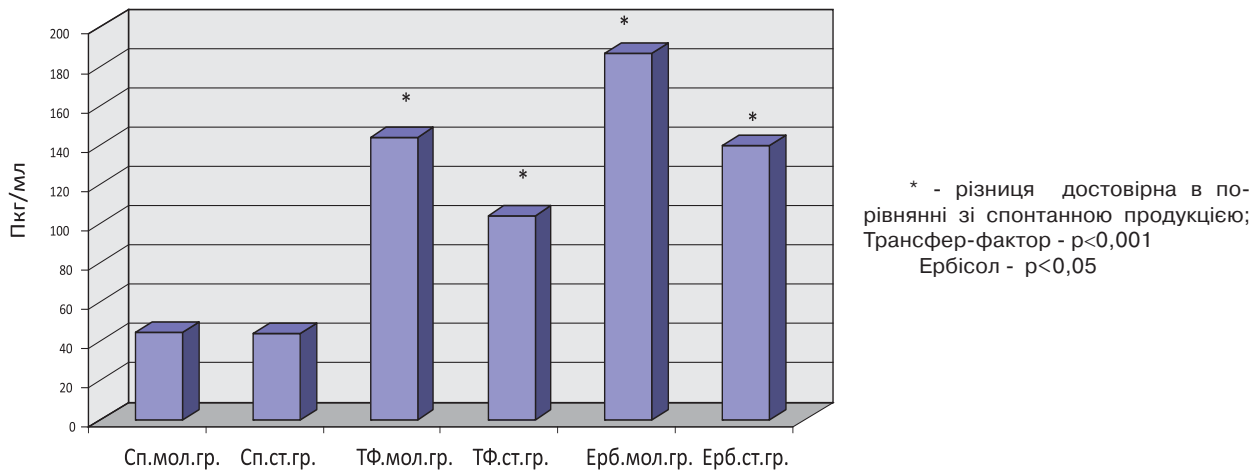


Рис. 4. Продукція γ -ІФН клітинами здорових донорів під впливом імунотропних препаратів

Допускають, що ІЛ-4, який індукує проліферацію В-лімфоцитів, експресію рецепторів до Fc-фрагменту ІgЕ, включає синтез Іg і являється антагоністом ІФН- γ , подавляючи продукцію ІЛ-1, TNF- β , ІЛ-6, ІЛ-8 і цитотоксичну активність Т-лімфоцитів, відіграє важливу роль в формуванні алергічних реакцій негайного типу [2].

Отримані результати визначення функціональної активності Т-хелперів 2 типу по продукції ІЛ-4 під впливом імунотропних препаратів у здорових донорів в умовах *in vitro* представлені на рис. 5

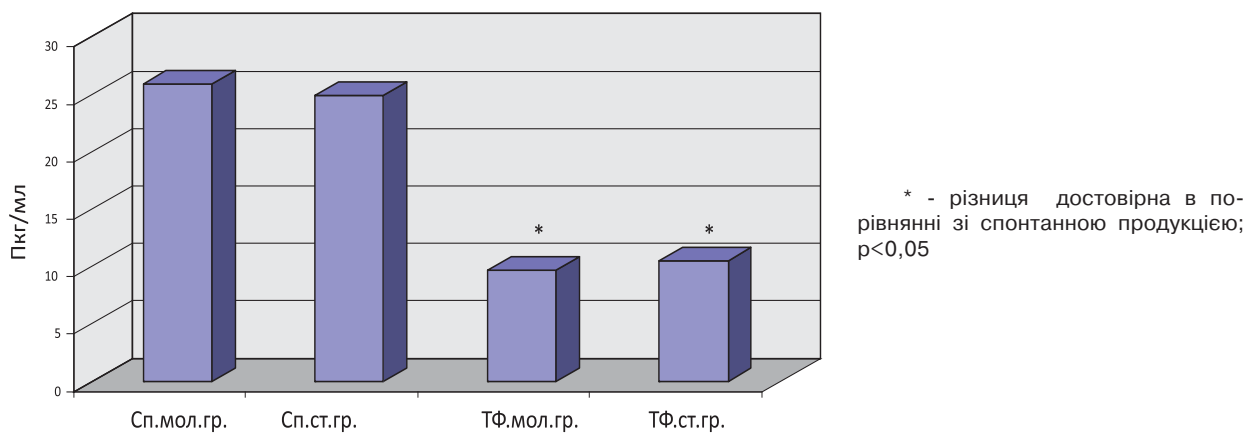


Рис. 5. Продукція ІЛ-4 клітинами здорових донорів під впливом препарату Трансфер-фактор

Як видно із рис. 5, спонтанна продукція ІЛ-4 у групі молодшого віку склала – $25,9 \pm 2,4$ рг/ml у групі старшого віку – $24,9 \pm 3,6$ рг/ml.

При додаванні до культури клітин препарату Трансфер-фактор ми спостерігали достовірне зниження продукції ІЛ-4 у групі молодшого віку – $9,7 \pm 1,5$ рг/ml, групі старшого віку – $10,5 \pm 2,6$ рг/ml) ($p < 0,05$) у порівнянні зі спонтанною продукцією.

Перші публікації, які з'явилися в періодичних виданнях останніх років були присвячені так званим Т-регуляторним лімфоцитам, які були виділені як окрема група клітин за їх здатність

обмежувати поширення запального процесу. На думку авторів, ці клітини здатні попереджати утворення аутоімунних реакцій і визначають розвиток стану імунологічної толерантності. Відомо, що їх функціональна регуляторна активність обумовлена синтезом TGF- β і ІЛ-10, дефіцит яких здатний визначати формування персистуючого алергічного запалення [2].

Результати функціональної активності Т-регуляторних клітин за продукцією ІЛ-10 представлені на рис. 6

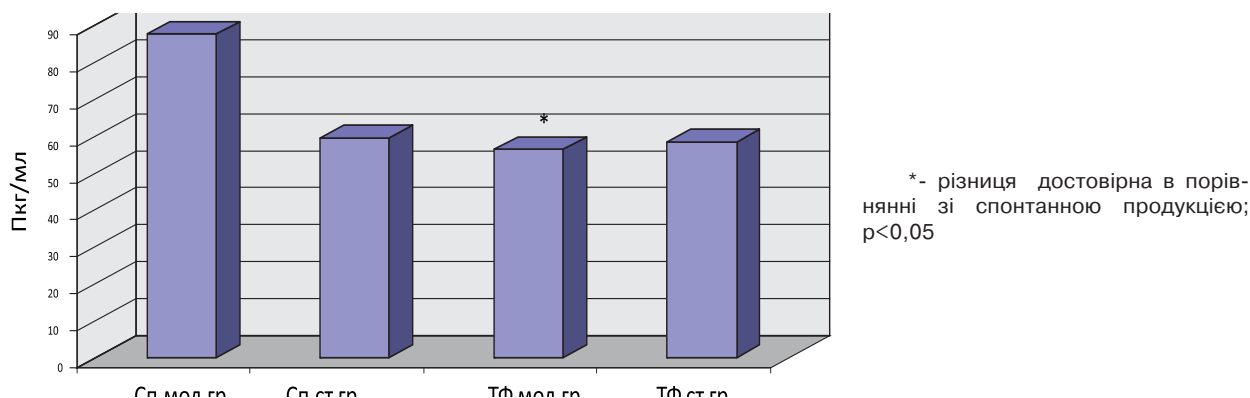


Рис. 6 Продукція ІЛ-10 клітинами здорових донорів під впливом Трансфер-фактору

Як видно із рисунка 6, показники спонтанної продукції ІЛ-10 клітинами здорових донорів у групі молодшого віку в середньому були – 87,7±18,8 pg/ml та у групі старшого віку – 59,6±11,2 pg/ml.

Додавання препарату Трансфер-фактор до культури клітин приводило до достовірного зниження продукції ІЛ-10 в порівнянні зі спон-

танним рівнем у групі молодшого віку – 56,4±13,2 pg/ml, у групі старшого віку спостерігаємо продукцію цитокіну на рівні спонтанного – 58,5±13,0 pg/ml.

Результати визначення функціональної активності Т-регуляторних клітин за продукцією TGF-β представлені на рис. 7

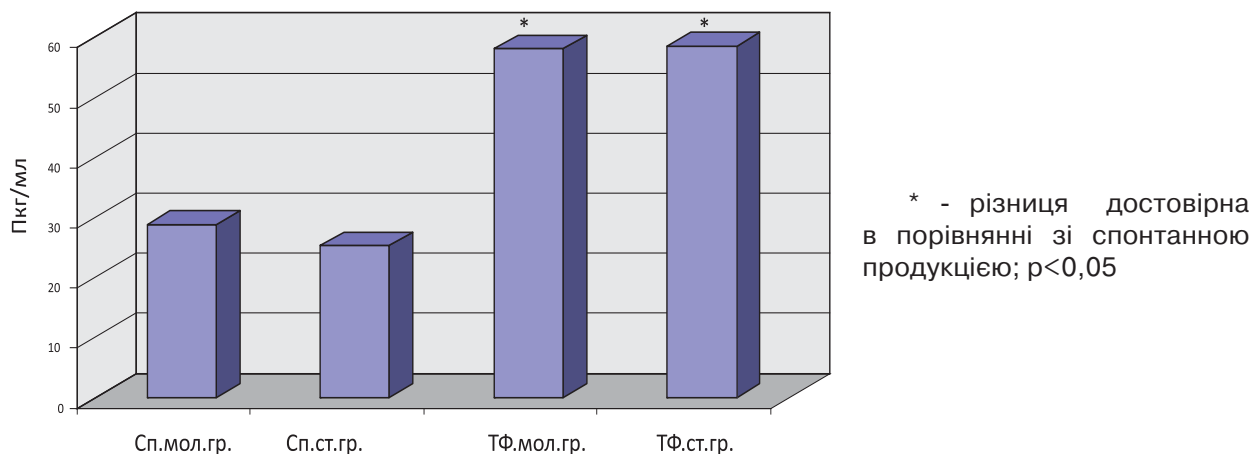


Рис. 7 Індукція TGF-β під впливом препарату Трансфер-фактор

Як видно із рис. 7, спонтанна продукція TGF-β клітинами здорових донорів у групі молодшого віку склала – 28,8±2,1 pg/ml; у групі старшого віку – 25,3±5,7 pg/ml.

Культивування клітин з препаратом Трансфер-фактор призводило до достовірного підвищення у групі молодшого віку – 58,1±5,0 pg/ml та групі старшого віку – 58,5±2,7 pg/ml в порівнянні зі спонтанною продукцією (p<0,05).

ВИСНОВКИ

1. Препарат Трансфер-фактор як і препарат Ербісол достовірно підвищують у обох групах продукцію ІЛ-12, α-ІНФ, ІЛ-2, γ-ІНФ.
2. Препарат Трансфер-фактор у обох групах в умовах in vitro достовірно підвищував продукцію регуляторними клітинами ТФР-β; достовірно знижував продукцію ІЛ-4 Т-хелперами 2 типу в обох групах та продукцію ІЛ-10 регу-

ляторними клітинами у групі молодшого віку, тоді як група старшого віку залишалась на рівні спонтанної продукції.

3. Найкраще себе проявили в умовах *in vitro* препарат Трансфер-фактор у групі молодшого віку та препарат Ербісол в обох групах за продукцією ІЛ-12, ІЛ-2, α -ІНФ та γ -ІНФ.
4. У групі старшого віку по продукції ІЛ-12 та α -ІНФ проявив себе препарат Ербісол.

ЛІТЕРАТУРА

1. *Возианов А.Ф.* Цитокины биологические и противоопухолевые свойства / Бутенко, Зак К.П. // Киев, Наукова думка. – 1998. – 317 с.
2. *Дранник Г.Н.* Клиническая иммунология и аллергология: пособие [для студ., врачей]/ Дранник Г.Н.- Киев: 2010. – 552 с.
3. «Ефективність застосування Трансфер-факторів у комплексі імунореабілітаційних заходів»/ методичні рекомендації. – Київ: 2011. – 47 с.
4. *Карбышева Н.В., Татаринцев П.Б., Гранитов В.М. и соавт.* ТФ в лечении больных вирусными гепатитами. В кн. «Иммуно-реабилитация при инфекционно-воспалительных заболеваниях», Научно-практическая конференция с международным участием (сборник докладов). Барнаул, 2003, 29-32.
5. *Киприянов Д.В.* Результаты применения препарата Transfer Factor plus в лечении урогенитального хламидиоза. Стр. 39-41.
6. *Николаенко А.Н.* Новый украинский медицинский препарат Эрбісол. – К, 1994. – С. 4-9.
7. *Zeiser R.* Interleukin-2 receptor downstream events in regulatory T cells: Implications for the choice of immunosuppressive drug therapy / Negrin RS. // Cell Cycle. 2007;7:458–462.

РЕЗЮМЕ

ВЛИЯНИЕ ИММУНОТРОПНЫХ ПРЕПАРАТОВ НА ПРОДУКЦИЮ ЦИТОКИНОВ ЛИМФОИДНЫМИ КЛЕТКАМИ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ ЗДОРОВЫХ ДОНОРОВ РАЗНОГО ВОЗРАСТА В УСЛОВИЯХ IN VITRO

Савченко В.С.

ГУ «Институт урологии НАМН Украины»

В работе показаны результаты воздействия биологически активной добавки Трансфер-фактор и фармацевтического препарата Эрбісол в условиях *in vitro* на функциональную активность клеток периферической крови здоровых доноров разного возраста.

Установлено, что препарат Трансфер-фактор в условиях *in vitro* лучше себя проявил в группе младшего возраста по продукции ИЛ-12 и γ -ІНФ, а препарат Эрбісол – в группе старшего возраста по продукции ИЛ-2 и α -ІНФ.

Ключевые слова: Трансфер-фактор, Эрбісол, цитокины, Т-хелперы 1 типа, Т-хелперы 2 типа, Т-регуляторные клетки.

SUMMARY

EFFECT OF DRUGS ON IMMUNOTROPIC CYTOKINE PRODUCTION LYMPHOID CELLS OF PERIPHERAL BLOOD OF HEALTHY DONORS DIFFERENT AGES IN THE IN VITRO

Savchenko V.S.

Institute of Urology NAMS of Ukraine

The work demonstrates the effects of dietary supplement Transfer factor and pharmaceutical Erbisol of *in vitro* functional activity of peripheral blood cells from healthy donors of different ages.

Found that drug Transfer factor *in vitro* conditions showed themselves better in the group of younger age for the production of IL-12 and IFN γ -and Erbisol – in older age groups for the production of IL-2 and α -IFN.

Key words: Transfer factor, Erbisol, cytokines, T- helper type 1, T-helper type 2, T-regulatory cells.