

УДК: 615.371: 578.832.1

ВПЛИВ МОДИФІКОВАНИХ ІМУНОМОДУЛЯТОРІВ НА ФУНКЦІОНАЛЬНІ ВЛАСТИВОСТІ ЛІМФОЦИТІВ

Романова О.А., Мартинов А.В., Волянський А.Ю.,
Ігумнова Н.І., Сидоренко Т.А., Смілянська
М.В., Перемот С.Д., Кашпур Н.В.

ДУ «Інститут мікробіології та імунології ім.
І.І.Мечникова АМН України», Харків

Накопичений до теперішнього часу клінічний досвід свідчить, що лікування і профілактика більшості захворювань та їх ускладнень є ефективнішими при включенні у комплекс лікувальних заходів методів імунотерапії. Імуномодулюючий ефект засобів, спрямованих на регуляцію та нормалізацію імунних реакцій, багато у чому залежить від вихідного імунного статусу хворого, схеми лікування, а в разі застосування імуноторпних препаратів також від шляху їх введення та фармакокінетики.

Проте, лікування нативними препаратами пептидної природи має ряд суттєвих недоліків: білки швидко гідролізуються у кишечнику та відповідно використовуються виключно парентерально. Відносно короткий період напівжиття таких ліків в організмі хворих спонукає до частого використання великих доз з метою досягнення необхідного терапевтичного ефекту (наприклад, інтерферон) [1]. Ще одним важливим негативним фактором, що обмежує використання нативних чи рекомбінантних білкових препаратів, є їхня висока алергенність та імуногенність та пов'язані з ними сенситивні реакції [2].

Одним із шляхів підвищення ефективності лікарських засобів білкової природи є хімічна модифікація їх молекули, яка не призводить до значних змін в їх третинній та четвертинній структурах, а полягає у фізико-хімічній трансформації [3]. Такі ацильовані білки мають пролонговану дію, втрачають алергенність, мають більшу біологічну активність та відповідно є новим перспективним напрямком у розробці імуномодуляторів.

Зокрема, дослідження фундаментальних аспектів впливу часткового ацилювання структури білку (та надмолекулярних структур, таких як бактеріофаги та віруси) на його біологічну активність є важливим аспектом сучасної фармацевтичної науки та молекулярної біотехнології. В світі недостатньо вивчені хімічно модифіковані біополімери, у виробництво впроваджено тільки ПЕГильовані біополімери, і цей напрямок досліджень у розробці лікарських препаратів є вельми перспективним.

В лабораторії імунореабілітології ДУ «ІМІ ім. І. І. Мечникова АМН України» шляхом часткового ацилювання було отримано нові форми ІЛ-2 та тималіну, що, як припускається, мають потенційно

вищі імуномодельючі властивості порівняно з ронколейкіном (рекомбінантною формою ІЛ-2 людини [4], стимулятором проліферації В-лімфоцитів та диференціювання їх у плазматичні клітини, фактором проліферації Т-клітин та таким, що визначає імунну відповідь [5]) та тималіном (препаратом, що сприяє відновленню та підвищенню функціональної активності Т-системи імунітету, нормалізації імунних реакцій та антиітогенезу).

Виходячи з цього, метою дослідження було вивчення стимулюючої здатності ацильованих похідних сучасних імунокоректорів - ронколейкіну та тималіну щодо функціональних характеристик лімфоцитів експериментальних тварин і хворих з гострим коронарним синдромом (ГКС).

Доцільність використання зразків крові хворих з ГКС в експериментах базувалася на необхідності урахування вихідного стану імунної системи для вивчення впливу модифікованих імуномодуляторів. З цієї точки зору коректним було у якості експериментального об'єкту розглядати не тільки норму (клітини здорових донорів), але і патологію. Відомо, що імунний статус хворих з ГКС характеризується зниженою активністю клітинного імунітету (Th₁, CD⁺-клітин, цитотоксичних Т-лімфоцитів), наслідком чого є інгібіція продукції ІЛ-2, ФНПа та ІНФγ. Зрозуміло, що саме ця група хворих потребує стимуляції клітинної ланки, яку модифіковані імуномодулятори, що випробовувались, могли б здійснювати.

Робота виконана в рамках НДР «Молекулярне моделювання, синтез та дослідження властивостей імуномодуляторів, частково ацильованих рекомбінантних лімфокінів» (№ держреєстрації 0109U001641).

Матеріали та методи

Частково ацильовані ІЛ-2 та тималін було синтезовано за методикою, наведеною у [6]. Модифікація препаратів проводилася шляхом введення 2,5-діоксотетрафурану (бурштинового ангідриду) до молекули нативного ронколейкіну або тималіну.

В експериментах *in vitro*, що відображають інтегральні реакції клітинного імунітету - реакцію рецепторного апарату лімфоцитів та їх проліферативну активність, були використані тимоцити щурів-самців лінії Wistar, спленоцити мишей-самців лінії BALBc, лімфоцити периферичної крові хворих з гострим коронарним синдромом і здорових донорів-людей. Кров хворих з ГКС отримували за договором про наукове співробітництво з міської клінічної лікарні №8. Дослідні тварини були інтактними і утримувались у віварії у стандартних умовах.

Оцінка спонтанної та індукованої проліферації лімфоцитів

Для отримання клітин тимусу або селезінки тварин морталізували декапітацією під ефірним наркозом, готували в стерильних умовах на льоду суспензію тимоцитів або спленоцитів. Вилучений тимус або селезінку гомогенізували, отриману

клітинну суспензію фільтрували через капроновий фільтр, тричі відмивали у повному культуральному середовищі. У разі дослідження лімфоцитів периферичної крові людини мононуклеари виділяли у градієнті фікола-верографіна густиною 1,078. Для проведення культивування використовували суспензію з концентрацією 5×10^6 кл/мл. Досліджувані препарати додавали до клітинної культури в кількості: тималін та ацильований тималін – по 280×10^{-7} мг/мл, ронколейкін та ац ІЛ-2 – по 200 МО/мл.

Клітини інкубували протягом 3 діб у вологій камері, в атмосфері, збагаченій CO_2 , в повному культуральному середовищі (поживному середовищі (RPMI-1640 – для клітин тварин, 199 – для людських лімфоцитів) з глютаміном, антибіотиками, 5% ембріональної телячої сироватки і буферним розчином HEPES (5 ммоль/л)) з додаванням та без додавання препаратів. Після закінчення культивування з клітинних суспензій готували препарати-мазки для морфологічного дослідження. В препаратах, пофарбованих за Романовським-Гімза, визначали відсоток лімфобластів по відношенню до загальної кількості лімфоїдних клітин, підраховуючи не менше 250 лімфоїдних клітин на препарат.

Оцінка експресії рецепторів на Т-лімфоцитах людини і тварин

Для фенотипування дозрілих Т-лімфоцитів у периферичній крові донорів використовували МКАТ CD3^+ , помічені ФІТЦ. Мононуклеари периферичної крові виділяли за допомогою центрифугування у градієнті густини фікола-верографіна при $d = 1,078$. Перед фенотипуванням зразки гепаринизованої периферичної крові інкубували з досліджуваними препаратами протягом 1 години. Реакцію оцінювали, використовуючи люмінесцентний мікроскоп. Підрахунок здійснювали на 100 лімфоцитів, результат виражали у відсотку клітин, що виявляли люмінесценцію.

Експресію рецепторів до еритроцитів морської свинки на лімфоцитах щурів та до еритроцитів барана на лімфоцитах мишей в присутності ацильованих тималіну та ІЛ-2 визначали за тестом Е-розеткоутворення [7]. Перед виконанням реакції виділені тимоцити або спленоцити інкубували з препаратами протягом 1 години. Підраховуючи 200 лімфоцитів, Е-розеткоутворюючі клітини (Е-РУК) визначали за приєднання не менше трьох еритроцитів. Результат виражали у відсотку Е-РУК по відношенню до загального числа підрахованих лімфоцитів.

В експериментах було досліджено 11 зразків периферичної крові здорових донорів, 12 – хворих з ССН, 13 тимусів щурів, 15 селезінок мишей, кожна серія експериментів нараховувала 4 повтори.

При статистичному аналізі результатів використовували параметричні методи. Визначали середнє арифметичне (М) та середньоквадратичне відхилення (σ). Вірогідність різниці між показниками різних груп оцінювали за критерієм Стюдента і вважали значущою при $p < 0,05$.

Результати та обговорення

За оцінки здатності досліджуваних препаратів викликати проліферацію лімфоцитів встановлено, що ацильований ІЛ-2 має здатність достовірно підвищувати мітотичну активність клітин зразків (окрім тимоцитів щурів) ефективніше, ніж ронколейкін: у 3,6 разів – клітин здорових донорів, у 2,9 разів – хворих з ГКС, в 1,9 – тимоцитів щурів, у 3,2 рази – спленоцитів мишей (Табл.).

Ацильована похідна тималіну, на відміну від ац.ІЛ-2 і нативного тималіну, не викликала стимуляції спонтанного бластогенезу лімфоцитів, за виключенням тимоцитів щурів, проте і в даному випадку вона поступалась реакції, спричиненій тималіном.

Подібна тенденція простежувалась і при вивченні ФГА-індукованої проліферації лімфоїдних клітин. Незважаючи на те, що посилення ФГА-індукованої поліклональної активації під впливом ацІЛ-2 не мало достовірних відмінностей від спричиненого дією ронколейкіну, ацильований препарат викликав помітну активацію РБТ на ФГА навіть у клітин здорових донорів. Що стосується ац.тималіну, він взагалі не впливав на стимульований бластогенез жодного зразка клітин (Табл.).

Відомо, що афінність рецепторів лімфоцитів, яка знижується у зв'язку з блокуванням і пригніченням їх експресії на клітинах факторами та медіаторами, присутніми в крові хворих, може відновлюватись після впливів, що викликають деблокування рецепторів [8]. В той же час модулюючі ефекти залежать від низки умов, у тому числі від вихідного стану імунної системи. При цьому для успішного прогнозування ефекту важливо враховувати як чутливість до препарату окремих клітин, так і лабільної комплексної системи, до якої вони належать.

Таблиця. Вплив імуностимуляторів на функціональні характеристики лімфоцитів in vitro (M±σ)

Препарати	БТЛ спонтанна, %	ФГА-індукована БТЛ, %	Експресія рецепторів на лімфоцитах, %
Без препаратів	7,8±0,4	63,3±3,7	49,3±2,9
	8,9±0,5	50,6±3,5	30,1±2,0
	26,3±2,1	73,2±3,8	36,6±2,5
	16,1±0,7	65,4±4,2	22,3±1,2

Препарати	БТЛ спонтанна, %	ФГА-індукована БТЛ, %	Експресія рецепторів на лімфоцитах, %
Тималін	9,8±0,4* 10,8±0,5* 41,6±2,8* 21,6±1,0*	70,7±4,2 62,7±3,6* 95,2±4,7* 75,2±3,8	55,5±3,2 42,5±2,8* 49,4±2,7* 28,6±1,4
Ацильований тималін	8,5±0,5** 8,1±0,6** 34,5±2,3* 18,4±0,9**	65,2±3,9 51,8±2,6 80,6±3,8 68,1±3,5	50,5±5,2 35,6±2,7 39,0±2,1 24,3±1,1
Ронколейкін	18,7±1,0* 20,9±1,6* 37,3±2,1* 36,0±2,2*	72,1±4,3 64,3±4,7* 89,1±3,7* 78,5±4,7*	59,3±3,2 48,4±3,4* 51,3±2,3* 30,1±1,8*
Ацильований ІЛ-2	28,1±2,0* 25,8±1,6* 49,9±2,2* 52,3±3,5*	75,9±5,2* 68,3±4,6* 88,3±4,1* 81,5±4,7*	64,3±5,2* 55,3±3,6* 67,4±4,3* 32,3±2,0*

Примітки: 1. Дані подані у порядку: лімфоцити здорових донорів-людей, лімфоцити хворих з ГКС, лімфоцити тимусу шурів, лімфоцити селезінки мишей. 2. * - достовірність відмінностей у порівнянні з контролем, $p < 0,05$, ** - достовірність відмінностей ацильованих препаратів від нативних, $p < 0,05$.

Порівняльне дослідження дії отриманих ацильованих препаратів на реакцію рецепторного апарату лімфоцитів різних органів та видової приналежності знову продемонструвало безперечний позитивний ефект ацильованого ІЛ-2. Достовірне підвищення експресії рецепторів на Т-лімфоцитах під дією цього препарату спостерігалось у всіх досліджених зразках клітин (на 30,4% - здорових донорів, на 84,3% - хворих з ГКС, на 84,1% - тимоцитів шурів, на 44,8% - спленоцитів мишей). У випадку застосування тималіну експресія рецепторів на тимоцитах шурів зростала на 35,4%, тоді як ацитималін не викликав достовірних змін цієї функції клітин. Присутність у зразках периферичної крові здорових донорів тималіну або його ацильованої форми достовірних змін експресії CD3⁺ також не виявила.

Таким чином, в результаті експериментів можна висновити, що досліджений препарат ацильований ІЛ-2 має достатньо високий імуностимулюючий потенціал у застосованих тестах *in vitro*, що характеризують функції лімфоцитів. Відомо, що Т-лімфоцити є найважливішим елементом кровотворного мікрооточення [9]. Інтерлейкін-3 (ІЛ-3), що продукується активованими Т-лімфоцитами, належить до найбільш ранньодіючих гемопоетинів, які стимулюють процеси проліферації та диференціювання ранніх кровотворних попередників [10]. Окрім цього фактора, Т-лімфоцити також продукують ІЛ-6, ІЛ-7, ГМ-КСФ – цитокіни, що справляють стимулюючий вплив на гемопоєз. Через активацію макрофагів та

ретiculoцитів, що формують мікрооточення, Т-лімфоцити здатні опосередковано контролювати і регулювати мієло- та лімфопоез у кровотворній тканині [11,12]. Отже, вплив на Т-компаратмент імунітету є надважливим як для стимуляції В-ланки, тобто спрямування проліферації лімфоцитів в бік формування дозрілих В-клітин, так і на активацію кровотворення взагалі, що має неабияке значення для корекції імунної відповіді у поширених випадках наявності імунодефіциту. У зв'язку з проблемою пошуку нових речовин, які можуть забезпечити розширення спектру більш ефективних імунокоректорів, можна припустити, що такою складовою або самостійним препаратом, після додаткового тестування *in vivo* та *in vitro*, може виявитись ацильований ІЛ-2.

Висновки

1. Отримана шляхом часткового ацилювання похідна ІЛ-2 має ефект стимуляції клітинних імунних реакцій *in vitro*, більш виражений, ніж препарат ронколейкін.

2. Отримана шляхом ацилювання нова форма тималіну продемонструвала найнижчу імуностимулюючу здатність порівняно з тималіном та ронколейкіном, що виключає можливість її потенційного застосування у якості імунокоректора.

Список літератури

1. Zeuzem S., Feinman S. V., Rasenack J. et al. PEG-interferons // N. Engl. J. Med. – 2000.- Vol. 343, N 23.- P. 1666 – 1672.

2. Muggia F. PEGylated liposomes with downorubicine // From Research to Practise. – 2001. – Vol.3, №1. – P.1-3.
3. Мартинов А.В., Черних В.П. Хімічна модифікація високомолекулярних лікарських засобів-продуктів біотехнології як інструмент тонкого впливу на їх фармакологічні властивості //Клінічна фармація. – 2002. – Т.6, №3. – С.3-8.
4. Попов Н.Н., Савченко В.Н., Моджекву Ч.Ч., Куринная Е.Г. Виды и средства иммунотерапии. – Харьков:Гриф. – 2002. – С.59.
5. Попов Н.Н., Лавров В.Ф., Солошенко Э.Н. Клиническая иммунология и аллергология. – М.:Реинфор. – 2004. – С.56-81.
6. Martynov A.V., Smelyanskaya M.V. Antiproliferative properties of chemically modified α -2 β -recombinant interferon // J. of Interf.& Cytokine Res. – 2005. – Vol.25, N 7. – P.414-417.
7. Запорожец Т.С., Лихобабин В.Я., Беседнова Н.Н. и др. Влияние иммуномодуляторов различной природы на экспрессию маркеров лимфоцитов у больных меланомой // Медицинская иммунология. – 2006. - №2. – С. 64-68.
8. Передерий В.Г., Земсков А.М., Бычкова Н.Г., Земсков В.М. Иммунный статус, принципы его оценки и коррекции иммунных нарушений. – К.:Здоров'я. – 1995. – 210 с.
9. Фриденштейн А.Я., Лурия Е.А. Клеточные основы кроветворного микроокружения. – М.:Наука. – 1980. – 244 с.
10. Гольдберг Е.Д., Дыгай А.М., Жданов В.В., Хлусов И.А. Динамическая теория регуляции кроветворения // Бюл. эксп. биол. и мед. – 1999. – Т.127, №5. – С.484-494.
11. Дыгай А.М., Шахов В.П. Роль межклеточных взаимодействий в регуляции гемопоэза. – Томск. – 1989. – 165 с.
12. Бабаева А.Г. Единство и противоположность цитогенетической активности лимфоцитов и их антителообразующей функции при восстановительных процессах в органах // Бюл. эксп. биол. и мед. – 1999. – Т.128, №11. – С484-490.

УДК: 615.371: 578.832.1

ВПЛИВ МОДИФІКОВАНИХ ІМУНОМОДУЛЯТОРІВ НА ФУНКЦІОНАЛЬНІ ВЛАСТИВОСТІ ЛІМФОЦИТІВ

Романова О.А., Мартинов А.В., Волянський А.Ю., Ігумнова Н.І., Сидоренко Т.А., Смілянська М.В., Перемот С.Д., Кашпур Н.В.

Вивчено вплив синтезованих частково ацильованих похідних інтерлейкіну-2 та тималіну на функціональні характеристики лімфоцитів (здатність до проліферації та реакцію рецепторного апарату) *in vitro* з урахуванням вихідного стану імунної системи (хворі з гострим коронарним синдромом або здорові особи), видової та органної приналежності

(лімфоцити периферичної крові людини, тимусу щурів, селезінки мишей). Виявлено виражений стимулюючий ефект ацильованого ІЛ-2 відносно всіх типів клітин, що були досліджені. Зроблено висновок про перспективність використання отриманої похідної ІЛ-2 у вигляді складової або самостійного препарату, що має високі імуномодельючі властивості, після додаткових досліджень *in vivo* та *in vitro*.

Ключові слова: лімфоцити, імуномодулююча здатність, модифіковані препарати.

УДК: 615.371: 578.832.1

ВЛИЯНИЕ МОДИФИЦИРОВАННЫХ ИММУНОМОДУЛЯТОРОВ НА ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ СВОЙСТВА ЛИМФОЦИТОВ

Романова Е.А., Мартынов А.В., Волянский А.Ю., Игумнова Н.И., Сидоренко Т.А., Смелянская М.В., Перемот С.Д., Кашпур Н.В.

Изучено влияние синтезированных частично ацилированных производных интерлейкина-2 и тималина на функциональные характеристики лимфоцитов (способность к пролиферации и реакцию рецепторного аппарата) *in vitro* с учетом исходного состояния иммунной системы (больные с острым коронарным синдромом или здоровые испытуемые), видовой и органной принадлежности (лимфоциты периферической крови человека, тимуса крыс, селезенки мышей). Обнаружен выраженный стимулирующий эффект ацилированного ИЛ-2 по отношению ко всем типам исследованных клеток. Сделан вывод о перспективности использования полученной производной ИЛ-2 в виде составляющей или самостоятельно-го препарата, обладающего высокими иммуномодулирующими свойствами, после дополнительных исследований *in vivo* и *in vitro*.

Ключевые слова: лимфоциты, иммуномодулирующая способность, модифицированные препараты.

УДК: 615.371: 578.832.1

MODIFIED IMMUNOMODULATORS EFFECT ON FUNCTIONAL PROPERTIES OF LYMPHOCYTES

Romanova E.A., Martynov A.V., Volyansky A.Yu., Igumnova N.I., Sydorenko T.A., Smelyanskaya M.V., Peremot S.D., Kashpur N.V.

Influence of the partly succinylated derivates of interleukin-2 and thymalin is studied on functional characteristics of lymphocytes (capacity for proliferation and reaction of receptor apparatus) *in vitro* taking into account the initial state of the immune system (patients with a acute coronary syndrome or healthy examinees), specific and organ belonging (lymphocytes of peripheral blood of man, thymus of rats, spleen of mice). The expressed stimulant effect acylated IL-2 in relation to all types of tested cells is found out. A conclusion is done about perspective of the use of the got derivate IL-2 as constituent or independent drug possessing high immunopotentiating properties, after additional researches *in vivo* and *in vitro*. **Keywords:** lymphocytes, immunomodulation ability, modified drugs.