

## ПОТЕНЦІЙОВАНИЙ ІМУНОМОДУЛЮЮЧИЙ ВПЛИВ ЧАСТКОВО АЦИЛЬОВАНОГО ІНТЕРЛЕЙКІНУ-2 В ЕКСПЕРИМЕНТІ

*О.А. Романова, А.В. Мартинов, Н.І. Ізумнова, Т.А. Сидоренко, В.І. Чернявський,  
М.В. Смілянська, С.Д. Перемот*

Інститут мікробіології та імунології імені І.І.Мечникова АМН України, Харків

### РЕЗЮМЕ

Проведені дослідження імуномодулюючої здатності нової форми ІЛ-2, отриманої шляхом часткового ацилювання, продемонстрували, що в експериментах *in vivo* та *in vitro* препарат суттєво потенціює спонтанну бласттрансформуючу активність лімфоцитів. Більш виражений ефект посилення мітотичної активності клітин було відмічено за введення ацІЛ-2 в культуру *in vitro*.

**КЛЮЧОВІ СЛОВА:** бласттрансформація, лімфоцит, імуностимуляція, інтерлейкін-2

Незважаючи на вагомі досягнення фармакології у галузі боротьби з патогенами, вакцинація зостається основним способом захисту організму від мікробної інфекції. Проте, на результат вакцинації справляє вплив не тільки застосований препарат, але і стан макроорганізму. Широко розповсюджена дисфункція імунної системи, наслідком якої стають часті респіраторні інфекції, дисбактеріози, алергічні реакції, створює фон до зниження реальної ефективності щеплення. В той же час існують препарати, здатні посилювати імунну відповідь, корегуючи кількісні та функціональні зміни імунокомпетентних клітин. Одним з таких сучасних імунокоректорів є ронколейкін – рекомбінантна форма ІЛ-2 людини [1]. Дія ІЛ-2 на В-лімфоцити проявляється у стимуляції їх проліферації та диференціювання у плазматичні клітини. Окрім цього, цитокін виступає як фактор проліферації Т-клітин і визначає Т-клітинну імунну відповідь [2].

В лабораторії імунореабітології ІМІ ім. І. І. Мечникова АМН України шляхом часткового ацилювання було отримано нову форму ІЛ-2, що, як припускається, має потенційно вищі імуноделюючі властивості порівняно з ронколейкіном.

Метою даної роботи було дослідження ізольованого (без вакцини) впливу частково ацильованого ІЛ-2 (ацІЛ-2) на реакцію бласттрансформації лімфоцитів (РБТЛ) – показника загальної імунореактивності організму.

Дослідження проведено в рамках науково-дослідної роботи Інституту «Ацильовані похідні білків та полісахаридів антигену сьнягнійної палички, розробка на їх основі вакцини» (№ держреєстрації 0106U003265).

### МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ

Частково ацильований ІЛ-2 було синтезовано за методикою, наведеною у [3].

Вплив препарату на РБТЛ було досліджено на мишах BALBc *in vivo* та *in vitro*.

В першій серії експериментів ац- ІЛ-2 вводили тваринам в/м в дозі 285 МО на мишу. На 3-ю добу тварин морталізували декапітацією під ефірним наркозом, готували в стерильних умовах суспензію клітин селезінки для дослідження спонтанної РБТЛ. Для цього орган гомогенізували, фільтрували скрізь капроновий фільтр, отриману суміш клітин тричі відмивали центрифугуванням у поживному середовищі Ігла з глютаміном, антибіотиками, 5% ембріональної телячої сироватки і буферним розчином HEPES (5 ммоль/л) при 1500 об/хв протягом 10 хв. Отриману суспензію розводили поживним середовищем Ігла з глютаміном таким чином, щоб  $5 \times 10^6$  клітин містилось в 1 мл середовища і розливали по 1 мл на флакон для культивування, далі додавали ембріональну телячу сироватку (Serva) (10%), HEPES (Serva) (10 ммоль/л), пеніцилін (100 Од/мл) та стрептоміцин (100 мкг/мл). В дослідках з бласттрансформації флакони з культурами клітин інкубували у вологій камері, в атмосфері, збагаченій  $CO_2$ , протягом 72 годин. Після закінчення інкубації вміст проб відмивали центрифугуванням при 1500 об/хв – 10 хв, з отриманого осаду готували препарати – мазки для морфологічного дослідження, фіксували етиловим спиртом та фарбували за Романовським-Гімза. У препаратах враховували відсоток лімфобластів по відношенню до загальної кількості лімфоїдних клітин, підраховуючи не менше 250 лімфоїдних клітин на препарат.

В другій серії експериментів ац ІЛ-2 вводили безпосередньо в культуру клітин під час постановки РБТЛ, у кількості 200 МО/мл.

Паралельними групами проб у першій серії експериментів були: культура клітин мишей, що отримали ронколейкін, та культура спленоцитів інтактних тварин; у другій серії – культура, до якої вводився ронколейкін та культура спленоцитів інтактних мишей.

Кожна група проб у першій чи другій серії експериментів складалась з 3-5 аналогічних зразків культуральних суспензій, кожна серія експериментів нараховувала 4 повтори. Для статистичного аналізу результатів використовували параметричні критерії з визначенням середнього значення (M) і його стандартного відхилення ( $\pm m$ ). Оцінку достовірності різниці між порівнюваними показниками здійснювали за допомогою критерію Ст'юдента. Відмінність між порівнюваними величинами вважали вірогідною при  $p < 0,05$ .

## РЕЗУЛЬТАТИ ТА ОБГОВОРЕННЯ

Введення ацІЛ-2 *in vivo* викликало посилення проліферативної активності лімфоцитів в 1,7 рази у порівнянні з клітинами інтакт-

тних тварин (табл.). При цьому достовірне підвищення (на 27%) спонтанної бласттрансформуючої здатності у тварин, що отримали препарат, спостерігалось також і у порівнянні з групою мишей, яким було зроблено ін'єкцію ронколейкіну.

В серії експериментів з додаванням ацІЛ-2 безпосередньо до культури клітин селезінки було отримано більш показові результати (табл.). Так, при короткочасному культивуванні спленоцитів з ацІЛ-2 спонтанна проліферативна активність лімфоцитів виросла у 3,2 рази і значно (в 1,4 рази) превалювала над бласттрансформуючою здатністю клітин, культивованих в присутності ронколейкіну.

Таблиця

Проліферативна активність лімфоцитів селезінки мишей за введення ацІЛ-2 *in vivo* та *in vitro* (M $\pm$ m)

Умови експерименту	Інтактні клітини (%)	Після введення ронколейкіну (%)	Після введення ацІЛ-2 (%)
In vivo	17,0 $\pm$ 1,0	23,5 $\pm$ 2,1	30,3 $\pm$ 1,9***
In vitro	16,5 $\pm$ 0,9	36,0 $\pm$ 2,7	52,3 $\pm$ 3,7***

\* - достовірність відмінностей показників проб з введенням ац ІЛ-2 від показників проб інтактних клітин;

\*\* - достовірність відмінностей показників проб з введенням ацІЛ-2 від показників проб з введенням ронколейкіну.

Зі вступом лімфоцитів у мітотичний цикл у більшості з них посилюється секреторна активність. При цьому Т-клітини продукують різноманітні лімфокіни, в тому числі ІЛ-2, а В-лімфоцити – імуноглобуліни.

1-2 години після контакту зі стимулятором мітогенезу, а через 24 години клітина вступає в мітоз. Саме цим, очевидно, пояснюються більш виражені результати дії ацІЛ-2 на рівень проліферації лімфоцитів за безпосереднього введення препарату в культуральне середовище. При умовах, коли ацІЛ-2 надходить до організму *in vivo* (1 серія експерименту), вірогідно, спрацьовує ефект відстрочення дії цитокіну, і стимуляція мітогенезу дещо згасає протягом 5,5 діб, що передують детекції результатів РБТЛ.

Проте, як перша, так і друга серії проведених експериментів свідчать про більш високу здатність до стимуляції проліферативної активності імунних клітин препарату ІЛ-2, отриманого шляхом часткового ацилю-

вання у порівнянні з ронколейкіном. В культурі *in vitro* на ранніх стадіях активації лімфоцитів посилення процесів ацетилювання ядерних гістонів, що у кінцевому підсумку приводить до синтезу РНК, білка та утворення бластів, починається вже через

вання у порівнянні з ронколейкіном.

## ВИСНОВКИ

1. Частково ацильований ІЛ-2 достовірно посилює проліферативну активність лімфоцитів порівняно з ронколейкіном.
2. Вплив ацІЛ-2 на здатність лімфоцитів до бласттрансформації є більш вираженим при застосуванні препарату в умовах *in vitro* порівняно з попереднім введенням його інтактним тваринам.

Перспективним для подальшого вивчення імуномодуляторних можливостей створеного препарату з метою застосування його за вакцинації, на нашу думку, є дослідження його впливу на антиіогенез.

## ЛІТЕРАТУРА

1. Попов Н.Н., Савченко В.Н., Моджекву Ч.Ч., Куринная Е.Г. Виды и средства иммунотерапии. - Харьков: Гриф. - 2002. - С. 59.
2. Попов Н.Н., Лавров В.Ф., Солошенко Э.Н. Клиническая иммунология и алергология. -М.: Реинфор. - 2004. - С. 56-81.
3. Martynov A.V., Smelyanskaya M.V. // J. of Interf. & Cytokine res. - 2005.- Vol. 25. - № 7. - P. 414-417.

# ПОТЕНЦИРОВАННОЕ ИММУНОМОДУЛИРУЮЩЕЕ ДЕЙСТВИЕ ЧАСТИЧНО АЦИЛИРОВАННОГО ИНТЕРЛЕЙКИНА-2 В ЭКСПЕРИМЕНТЕ

*Е.А. Романова, А.В. Мартынов, Н.И. Изумнова, Т.А. Сидоренко, В.И. Чернявский, М.В. Смелянская, С.Д. Перемот*

Институт микробиологии и иммунологии имени И.И.Мечникова АМН Украины, Харьков

---

## РЕЗЮМЕ

Проведенные исследования иммуномодулирующей способности новой формы ИЛ-2, полученной путем частичного ацилирования, показали, что в экспериментах *in vivo* и *in vitro* препарат существенно потенцирует спонтанную бласттрансформирующую активность лимфоцитов. Более выраженный эффект повышения митотической активности клеток отмечался при введении ацИЛ-2 в культуру *in vitro*.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА:** бласттрансформация, лимфоцит, иммуностимуляция, интерлейкин-2

## POTENTIAL IMMUNOMODULATION ACTION OF PARTIAL ACYLATED INTERLEUKIN-2 IN EXPERIMENTS

*E.A. Romanova, A.V. Martyno, N.I. Igumnova, T.A. Sidorenko, V.I. Chernyavsky, M.V. Smelyanskaya, S.D. Peremot*

Mechnicov Institute of microbiology and immunology of AMSU, Kharkov

---

## SUMMARY

In the article were presented results about studied of immunopotential activity of new IL-2 – acylated derivatives. It was show, that preparation much increased spontaneous blasttransformation of lymphocytes in mice as *in vitro* and *in vivo*. Added of acIL-2 to lymphocete's cells culture resulted to more increasing of mitotic activity of lymphocytes than in control with native Roncoleukin.

**KEY WORDS:** blasttransformation, lymphocytes, immunostimulation, interleukin-2