

ИММУНОФАРМАКОЛОГИЯ

ИММУНОМОДУЛЯТОРЫ МИКРОБНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ ИММУНОВАК ВП-4 И ГМДП УСИЛИВАЮТ ЦИТОТОКСИЧЕСКУЮ АКТИВНОСТЬ МОНОНУКЛЕАРНЫХ ЛЕЙКОЦИТОВ И ПРОДУКЦИЮ ЦИТОКИНОВ У МЫШЕЙ

Н. К. Ахматова¹

Цель исследования: изучение цитотоксической активности мононуклеарных лейкоцитов и уровня цитокинов в сыворотке крови мышей при введении иммуномодуляторов микробного происхождения: поликомпонентной вакцины Иммуновак-ВП-4 и ГМДП (N-ацетилглюкозамин-N-ацетилмурамоил-дипептид, L-аланил-D-изоглутамин). Исследуемые препараты усиливают цитотоксическую активность мононуклеарных лейкоцитов селезенки мышей по сравнению с контрольной группой животных. Отмечено максимальное нарастание IL-6, IL-10, TNF- α , IFN- γ в сыворотке крови через 4 ч после введения иммуномодуляторов.

Ключевые слова: цитотоксическая активность, ВП-4, ГМДП, цитокины

ВВЕДЕНИЕ

Исследования последних лет выявили ключевую роль натуральных киллеров (НК-клеток) в противоопухолевом и противоинфекционном иммунном контроле. НК-клеточная активность может усиливаться различными агентами, такими как фактор окружения, стресс, пища, лекарственные средства. Некоторые из этих НК-клеточных стимуляторов используют в дополнительной и альтернативной медицине (complementary and alternative medicine — САМ) [13]. НК принадлежат к врожденному звену иммунитета и характеризуются как цитотоксические эффекторные клетки, обеспечивающие защиту у позвоночных и беспозвоночных животных, которые могут использовать аналогичные механизмы лизиса клеток-мишеней [7]. В настоящее время актуален поиск препаратов, активирующих НК. В качестве САМ могут быть предложены иммуномодуляторы микробного происхождения, поскольку они несут патоген – ассоциированные молекулярные структуры (ПАМС), распознаваемые системой врожденного иммунитета.

Цель исследования: изучение цитотоксической активности мононуклеарных лейкоцитов (МЛ) селезенки и уровня цитокинов в сыворотке крови мышей при введении иммуномодуляторов микробного происхождения: поликомпонентной вакцины Иммуновак-ВП-4, содержащей антигены условно-патогенных микроорганизмов, и ГМДП (N-ацетилглюкозамин-N-ацетилмурамоил-дипептид, L-аланил-D-изоглутамин), полученного путем химического синтеза.

¹ Лаборатория клеточной иммунологии ЭДиТО (зав. — проф. М. В. Киселевский) ГУ Российского онкологического научно-го центра им. Н. Н. Блохина РАМН, Москва, 115478, Каширское шос., 24.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

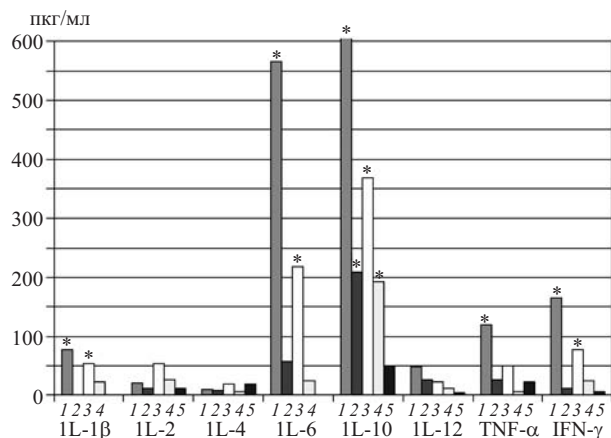
Препараты. В работе использованы иммуномодуляторы микробного происхождения:

поликомпонентная вакцина из антигенов условно-патогенных микроорганизмов Иммуновак ВП-4, содержащая комплекс патогенассоциированных молекулярных структур микроорганизмов (липополисахарид, пептидогликан, тейхоевые кислоты и др.), ГУ НИИВС им. И. И. Мечникова РАМН;

ГМДП: N-ацетилглюкозамин-N-ацетилмурамоил-дипептид (L-аланил-D-изоглутамин), является универсальным минимальным фрагментом клеточной стенки бактерий, получен путем химического синтеза (“Sigma”, США).

Вакцинация мышей. 20 мышей линии СВА массой 18 – 20 г иммунизировали внутривентриально однократно ВП-4 (200 мкг/мышь) и ГМДП (100 мкг/мышь). Дозы подобраны в соответствии с минимальными рекомендуемыми для применения у человека. Для получения НК-клеток использованы мононуклеарные лейкоциты (МЛ) селезенки мышей. Животных выводили из эксперимента под эфирным наркозом в соответствии с “Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных”.

Выделение МЛ. Селезенки мышей гомогенизировали в среде 199 (Институт полиомиелита и вирусных энцефалитов РАМН, Москва) и трижды осаждали центрифугированием. Взвесь спленоцитов центрифугировали при 400 g в течение 30 мин в градиенте плотности фиколл – урографина (“Pharmacia”, плотностью 1,077 г/см³). МЛ, образовавшие интерфазное кольцо, собирали пипеткой и трехкратно отмывали средой



Уровень цитокинов в сыворотке крови мышей линии СВА через 4 и 24 ч после внутрибрюшинного введения ВП-4 (200 мкг/мышь) и ГМДП (100 мкг/мышь).

По оси абсцисс — исследуемые цитокины; по оси ординат — содержание цитокинов, пкг/мл. * — $p < 0,05$. 1 — ВП-4 4 ч, 2 — ВП-4 24 ч, 3 — ГМДП 4ч, 4 — ГМДП 24ч, 5 — контроль.

199. После каждой отмытки в 10-кратном объеме среды клетки осаждали центрифугированием при 200 г.

Культивирование клеток YAC-1. Клетки опухолевой линии YAC-1 культивировали в полной среде RPMI-1640 (“ПанЭко”) с добавлением 2 мМ L-глутамина (“ПанЭко”), 5% фетальной сыворотки крупного рогатого скота и 0,1 мг/мл гентамицина сульфата (“Sigma”) при 37 °С в атмосфере 4,5 % CO₂. Клетки поддерживали в логарифмической фазе роста постоянным пассированием культуры через каждые 2–3 сут.

Цитотоксический тест. Цитотоксическую активность МЛ определяли на НК-зависимой линии клеток мышинной лимфомы YAC-1 в тесте восстановления 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолия бромида (МТТ-тест). Опухолевые клетки ($3 \cdot 10^4$ в 1 мл) инкубировали в культуральной среде с МЛ в соотношении 1:5 в плоскодонных 96-луночных микропланшетах (“Costar”, Франция) 18 ч при 37 °С и 4,5 % CO₂. Затем в лунки добавляли витальный краситель МТТ (“Sigma”). Результат оценивали спектрофотметрически по оптической плотности, измеряемой при длине волны 540 нм на мультискане MS (“Labsystem”, Финляндия) и рассчитывали процент лизиса опухолевых клеток (процент цитотоксичности).

Уровень цитокинов определяли иммуноферментным методом с использованием тест-систем фирмы “Biosource”, США.

Статистическую обработку данных проводили при использовании t -критерия Стьюдента, используя стандартный пакет статистических программ Windows 2000 (StatSoft 6.0).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Оценка влияния иммуномодуляторов микробного происхождения на цитотоксическую активность мононуклеарных лейкоцитов (МЛ) селезенки мышей линии СВА после иммунизации ВП-4 и ГМДП по отношению к клеткам НК-чувствительной мышинной лимфомы YAC-1 представлена в таблице. Соотношение мишень/эффектор составило 1:5. Данные таблицы свидетельствуют о том, что исследуемые иммуномодуляторы вызывали усиление цитотоксической активности МЛ селезенки мышей ($p < 0,05$) по сравнению с неиммунизированными мышами. Цитотоксический индекс (ЦИ) МЛ, показывающий отношение цитотоксичности МЛ иммунизированных мышей к цитотоксической активности МЛ в контрольной группе животных (вводили изотонический раствор натрия хлорида), повышался с 3,1 до 4,5 при иммунизации ВП-4 ($p < 0,001$), до 4,7 — при введении ГМДП ($p < 0,001$).

При изучении уровня цитокинов в сыворотках мышей при иммунизации исследуемыми иммуномодуляторами (рисунок) выявлено их максимальное возрастание в интервале 4 ч, после чего содержание их существенно снижалось. Отмечено увеличение IL-6, IL-10, TNF-α, IFN-γ ($p < 0,001$) по сравнению с уровнем у контрольных мышей. Уровень IL-6 у вакцинированных ВП-4 мышей через 4 ч повышался до $565 \pm 36,3$ пкг/мл, а затем снижался до $56,7 \pm 3,8$ пкг/мл у мышей, вакцинированных ГМДП. Содержание IL-6 повышалось до 218, затем снижалось до $23 \pm 1,5$ пкг/мл. Максимальным было значение IL-10 при вакцинации ВП-4 через 4 ч — 1928 ± 86 пкг/мл, затем к концу суток эти значения в сыворотках крови у мышей снижались до $210 \pm 11,2$ пкг/мл. Под действием ГМДП содержание IL-10 в интервале 4 ч было значительно меньше: $368 \pm 15,2$ пкг/мл. Содержание IL-12 у иммунизированных вакциной ВП-4 возрастало сначала в 9 раз

Цитотоксическая активность мононуклеарных лейкоцитов, выделенных из селезенки мышей линии СВА, после введения иммуномодуляторов микробного происхождения через 4 и 24 часа по отношению к клеткам линии YAC-1 (n = 20)

Препарат	4 часа		24 часа	
	Цитотоксичность, %	ЦИ, абс. ед.	Цитотоксичность, %	ЦИ, абс. ед.
ВП-4 200 мкг	$35,88 \pm 2,13^*$	3,1	$52,33 \pm 3,62^{**}$	4,5
ГМДП 100 мкг	$36,66 \pm 3,58^*$	3,1	$55,4 \pm 4,07^{**}$	4,7
Контроль	$11,7 \pm 0,97$	—	$11,7 \pm 0,97$	—

Примечание. Различия достоверны при сравнении с контролем при: * — $p < 0,05$; ** — $p < 0,001$. ЦИ — цитотоксический индекс.

(4 ч), затем почти в 5 раз (24 ч) по сравнению с контрольными животными, а при введении ГМДП — в 4,3 (4 ч) и 2,3 раза (24 ч), $p < 0,05$. Содержание TNF- α и IFN- γ в сыворотке вакцинированных ВП-4 мышей также статистически значимо было выше по сравнению с уровнем этих цитокинов при иммунизации ГМДП.

Значимое повышение содержания IL-6, IL-10, IL-12 и TNF- α и IFN- γ в сыворотке мышей при введении иммуномодуляторов микробного происхождения свидетельствует об активации клеток иммунной системы. IL-6 является активным фактором дифференцировки В- и Т-лимфоцитов, особенно индуктором конечного этапа созревания В-клеток и макрофагов, а также цитотоксических лимфоцитов. Действуя синергически с IL-3, вызывает дифференцировку стволовых клеток костного мозга. Повышение концентрации TNF- α ведет к усилению выработки IL-6 [3]. IL-10 известен как цитокин, продуцируемый широким спектром типов клеток, включая Т- и В-лимфоциты, кератиноциты, моноциты/макрофаги и ДК. Он активирует В-лимфоциты и NK-клетки, проявляет ингибирующий эффект на Т-клетки и активацию макрофагов [9]. IL-10 снижает продукцию провоспалительных цитокинов, таких как TNF- γ , IL-1, IL-6, IL-12 IFN- γ и GM-CSF, а также хемокинов IL-8 и CCL3. Кроме того, IL-10 ингибирует продукцию молекул, важных для запуска специфического иммунитета, таких как MHC II и к-стимулирующих молекул, например, CD86, тем самым ингибируя созревание антигенпрезентирующих клеток [8].

Повышение концентрации IL-12 в сыворотках мышей, индуцирует образование INF- γ в Т-лимфоцитах, который, в свою очередь, влияет на приобретение Т-лимфоцитами свойств Th1 типа [2]. Таким образом, ключевая роль IL-12 связана с направлением дифференцировки предшественников в Th1 клетки, стимуляцией дифференцировки наивных CD8⁺ Т-клеток в функционально активные цитотоксические Т-клетки, а также усилением цитолитической активности NK-клеток и их пролиферации. Это подтверждается усилением цитотоксического потенциала МЛ селезенки мышей, иммунизированных иммуномодуляторами микробного происхождения. При введении иммуномодуляторов синтезируется целый набор цитокинов, что способствует активации сложных механизмов межклеточных взаимодействий.

Выявлено, что ПАМС оказывают множественные эффекты на сигналы, генерируемые клетками врожденной иммунной системы и тем самым могут быть использованы как натуральные адьюванты, активирующие адаптивный иммунный ответ [4]. Пептидогликан (PG), являющийся ПАМС ГМДП, стимулирует макрофаги и ДК через TLR2. Стержневая составляющая часть PG, мурамилдипептид (MurNAc-L-Ala-D-IsoGln), однако, не распознается TLR2, но активирует клетки через внутриклеточный сенсорный протеин NOD2 [6]. Липотейхоевые кислоты (LTA) являются

амфипатическими, негативно заряженными гликолипидами, обнаруженными у большинства грампозитивных бактерий. Соответствующая очистка LTA *Staphylococcus aureus* или химический синтез LTA выявил, что они обладают выраженной способностью стимулировать TLR2 [10]. Известно, что липополисахарид (ЛПС) является основным компонентом поверхности мембран грамотрицательных бактерий. Для распознавания ЛПС TLR4 требуется участие различных акцессорных молекул. ЛПС сначала связываются с ЛПС — связывающим белком (LBP), который перемещает ЛПС в CD14. Точный механизм распознавания ЛПС молекулой CD14 остается не выявленным [11]. Окончательно ЛПС взаимодействует с TLR4 и инициирует как MyD88 — зависимый, так и независимый внутриклеточный сигнальный каскад [12].

Эксперименты показали, что введение ВП-4 вызывает значительное увеличение спектра цитокинов в сыворотке крови и способствует развитию иммунного ответа и дифференцировке Т — лимфоцитов преимущественно по Th1 — типу.

Механизм усиления цитотоксической активности лимфоцитов под влиянием вакцины ВП-4, очевидно, опосредован синтезом цитокинов, которые могут индуцировать лимфокинактированную цитотоксичность естественных киллеров. Известно, что естественные киллеры экспрессируют на своей поверхности рецептор к IL-2. Под действием IL-2 и некоторых других цитокинов усиливается их противоопухолевая активность. В ранее проведенных исследованиях показана способность ВП-4 стимулировать продукцию IL-2 и образование эндогенного IFN- α [1], которые могут повышать цитотоксичность естественных киллеров к опухолевым клеткам.

Представленные результаты свидетельствуют о том, что иммуномодуляторы микробного происхождения — поликомпонентная бактериальная вакцина Иммуновак-ВП-4 и ГМДП — усиливают элементы врожденного иммунитета у мышей. Поэтому их можно использовать в качестве иммуностимулирующих средств. Об этом свидетельствуют клинические исследования препарата ликолипид, активным началом которого является ГМДП [5]. Однако стимуляторы врожденного иммунитета следует с осторожностью применять при начинающейся инфекции, когда в крови начинается выброс цитокинов, или при глубоких иммунодефицитных состояниях со значительным снижением эффекторов иммунитета.

ВЫВОДЫ

1. Иммуномодуляторы микробного происхождения Иммуновак ВП-4 и ГМДП (N-ацетилглюкозамин-N-ацетилмурамоил-дипептид, L-аланил-D-изоглутамин) при однократном внутрибрюшинном введении мышам линии СВА (200 и 100 мкг/мышь соответственно) усиливают цитотоксическую активности мононуклеарных лейкоцитов (МЛ) селезенки по отно-

шению к клеткам NK-чувствительной мышинной лимфомы YAC-1. Цитотоксический индекс МЛ повышается с 3,1 до 4,5 при иммунизации ВП-4 ($p < 0,001$), до 4,7 — при введении ГМДП ($p < 0,001$).

2. В сыворотке периферической крови мышей линии СВА после однократного внутрибрюшинного введения Иммуновак ВП-4 и ГМДП возрастает уровень цитокинов: IL-6, IL-10, TNF- α , IFN- γ ($p < 0,001$). Максимальное возрастание уровня цитокинов отмечается в интервале 4 часов с постепенным снижением к концу суток. Содержание исследуемых провоспалительных и противовоспалительных цитокинов в сыворотке вакцинированных ВП-4 мышей было статистически значимо выше по сравнению с уровнем данных цитокинов при иммунизации ГМДП.

ЛИТЕРАТУРА

1. Л. П. Антонова, Т. П. Маркова, *Применение "бактериальной вакцины" ВП-4 в лечении хронического обструктивного бронхита и бронхиальной астмы*, *Астма*, **2**(1), 151 – 152 (2002).
2. М. А. Пальцев, *Введение в молекулярную медицину*, Медицина, Москва (2004), с. 496.
3. Л. В. Ковальчук, Л. В. Ганковская, М. В. Хорева, Е. В. Соколова, *Система цитокинов, комплемента и современные методы иммунного анализа*, Рос. гос. мед. ун-т, Москва (2001), с. 120.
4. Р. Меджитов, Ч. Джаневей, *Врожденный иммунитет*, *Казанский мед. ж.*, № 3, 161 – 167 (2005).
5. Б. В. Пинегин, Т. М. Андропова, М. Ю. Швецов, *Липоид. Современный подход к профилактике и лечению иммунодефицитных состояний*, Мед. Книга, Москва (2004), с. 84.
6. R. Athman and D. Philpott, *Curr. Opin. Microbiol.*, **7**, 25 – 32 (2004).
7. E. L. Cooper, E. Kauscheke, and A. Cossarizza, *Digging for natural immunity since Darwin and Metchnikoff*, *BioEssays*, **24**, 319 – 333 (2002).
8. V. Daniel, C. Naujokat, M. Sadeghi, et al., *Transplantation*, **79**(11), 1498 – 1506 (2005).
9. S. Hegde, J. Pahne, and S. Smola-Hess, *FASEB J.*, **18**(12), 1439 – 1441 (2004).
10. S. Morath, A. Stadelmaier, A. Geyer, et al., *J. Exp. Med.*, **195**, 1635 – 1640 (2002).
11. A. B. Shrom, E. Lien, P. Henneke, et al., *J. Exp. Med.*, **194**, 79 – 88 (2001).
12. K. Takeda and S., *Int. Immunol.*, **17**(1), 1 – 14 (2005).
13. K. Takeda and K. Okumura, *CAM and NK Cells, eCAM.*, **1**(1), 17 – 27 (2004).

Поступила 05.10.05

IMMUNOVAC VP-4 AND GMDP INCREASE THE CYTOTOXIC ACTIVITY OF MONONUCLEAR LEUKOCYTES AND CYTOKINE PRODUCTION IN MICE

N. K. Akhmatova

Blokhin Oncological Research Center, Kashirskoe Shosse 24, Moscow, 115478 Russia

The cytotoxicity of mononuclear leucocytes (ML) and the level of cytokines in mouse blood were estimated upon the administration of immunomodulators of microbial origin: a polycomponent vaccine Immunovak-VP-4 and GMDP (N-acetylglucosamin-N-acetylmuramoyl-dipeptide, L-alanyl-D-izoglutaminyl). The immunomodulators reinforced the cytotoxic ML activity of murine spleens ($p < 0.05$) in comparison to that in control mice. The maximum increase in IL-6, IL-10, TNF- α , IFN- γ in the blood was observed in 4 hours after administration of immunomodulators ($p < 0.001$).