

# ВЛИЯНИЕ ИММУНОМОДУЛЯТОРОВ ИММУНОВАК ВП-4 И ПРОФЕТАЛЬ НА ФУНКЦИОНАЛЬНУЮ АКТИВНОСТЬ МОНОНУКЛЕАРНЫХ ЛЕЙКОЦИТОВ

Лебединская Е.А.<sup>1</sup>, Ахматова Н.К.<sup>2</sup>, Лебединская О.В.<sup>1</sup>, Черешнев В.А.<sup>3</sup>, Родионов С.Ю.<sup>3</sup>, Киселевский М.В.<sup>4</sup>

<sup>1</sup> ГОУ ВПО «Пермская государственная медицинская академия им. академика Е.А. Вагнера» МЗ РФ

<sup>2</sup> ГУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова РАМН», Москва

<sup>3</sup> «Институт иммунологии и физиологии УрО РАН», г. Екатеринбург

<sup>4</sup> ГУ «Российский онкологический научный центр им. Н.Н. Блохина», Москва

**Резюме.** Изучена иммуномодулирующая способность препаратов бактериального (вакцина Иммуновак-ВП-4) и эукариотического происхождения (профеталь), основным действующим компонентом которых является человеческий  $\alpha$ -фетопротеин. Культивирование мононуклеарных лейкоцитов с иммуномодуляторами способствует увеличению количества клеток, экспрессирующих поверхностные антигены цитотоксических лимфоцитов, натуральных киллеров и натуральных киллеров Т-клеток. Оба препарата обладают выраженным противоопухолевым действием *in vitro*: индуцируют активацию киллерных свойств мононуклеаров периферической крови человека, которые при этом приобретают свойственный им фенотип.

**Ключевые слова:** иммуномодуляторы – Иммуновак-ВП-4, профеталь; натуральные киллеры, цитотоксическая активность, иммунофенотип.

*Lebedinskaya E.A., Akhmatova N.K., Lebedinskaya O.V., Chereshev V.A., Rodionov S.U., Kiselevsky M.V.*

## INFLUENCE OF IMMUNOMODULATING AGENTS IMMUNOVAK VP-4 AND PROFETAL ON FUNCTIONAL ACTIVITY OF MONONUCLEAR LEUKOCYTES

**Abstract.** Immunomodulating ability of a bacterial preparation (Immunovak VP-4 vaccine), and a compound of eukariotic origin (profetal), the main active component of human  $\alpha$ -fetoprotein were under investigation in present study. Culturing of mononuclear leukocytes with the immunomodulatory factors promotes quantitative increase of the cells that express surface antigens specific for cytotoxic lymphocytes, natural killers and natural killer T-cells. Both bio-active preparations possess an expressed anti-cancer effect *in vitro*, i.e., they induce activation of killing properties of human peripheral blood mononuclear leukocytes, which is accompanied by acquiring their characteristic phenotype. (*Med. Immunol.*, vol. 11, N 1, pp 15-20)

## Введение

Открытие молекулярно-клеточных механизмов действия эффекторов системы врожденного иммунитета позволило выдвинуть гипотезу, согласно которой иммунная система распознает

и уничтожает аномальные клетки, экспрессирующие опухолевые антигены, приводя к селекции клеток низкоиммуногенных клонов, способных ускользать от иммунного надзора. В связи с этим возникает необходимость более детального изучения роли эффекторов врожденного иммунитета, которые могут распознавать и лизировать дефектные по главному комплексу гистосовместимости (МНС) трансформированные клетки. Ключевая роль в осуществлении этих функций принадлежит натуральным киллерам (НК), которые и являются предметом настоящего исследования. По своей природе НК являются цитотоксическими лимфоцитами, которые спо-

### Адрес для переписки:

Лебединская Ольга Витальевна,

ГОУ ВПО «Пермская государственная медицинская академия

им. академика Е.А. Вагнера» МЗ РФ

614039, г. Пермь, ул. Полины Осипенко, 61, кв. 74.

Тел.: (3422) 44-55-23.

E-mail: lebedinska@mail.ru

способны уничтожать клетки, зараженные вирусами или внутриклеточными бактериями [6, 8] и опухолевые клетки [2, 7]. Маркерами NK-клеток служат антигены CD16, CD56 [6, 13, 15, 16].

Противоопухолевая биотерапия с использованием активированных натуральных киллеров имеет значительные перспективы и выходит за рамки считавшихся ранее «иммуночувствительных форм» злокачественных новообразований (меланома, рак почки и колоректальный рак). Она уже показала свою эффективность при раке легкого и яичников в отношении prolongации безрецидивного периода жизни у больных после радикальных операций и последующих курсов химиотерапии [12, 17].

Учитывая вышеизложенное, следует отметить, что перспективным направлением является поиск препаратов, активирующих цитотоксические лимфоциты, натуральные киллеры и другие факторы естественной резистентности организма, супрессированные под влиянием опухолевого процесса, оперативного вмешательства, химио- и лучевой терапии. Известно, что киллерная активность лимфоцитов может быть существенно повышена при воздействии различных факторов, в том числе и нецитокиновой природы [11].

Одним из таких агентов может служить бактериальный иммуномодулятор Иммуновак-ВП-4, несущий в своем составе патоген-ассоциированные молекулярные структуры (ПАМС), влияющие на различные звенья иммунной системы [1]. Другим препаратом, усиливающим киллерную активность лимфоцитов, является профеталь, содержащий человеческий  $\alpha$ -фетопроtein (АФП), который, как показано в наших предыдущих исследованиях, усиливает пролиферацию и дифференцировку эмбриональных фибробластов, цитотоксическую и пролиферативную активность мононуклеарных лейкоцитов периферической крови человека, индуцирует созревание дендритных клеток [3, 4, 5].

Цель исследования – изучение механизма действия иммуномодуляторов Иммуновак-ВП-4 (бактериальной природы) и препарата профеталь (эукариотического происхождения) на функциональную активность натуральных киллеров.

## Материалы и методы

Предметом исследования явились два иммуномодулятора, разрешенные в практике здравоохранения: поликомпонентная вакцина Иммуновак-ВП-4 из антигенных компонентов 4-х условно-патогенных микроорганизмов («НИИ вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова РАМН», Москва) и препарат профеталь (ЗАО «Институт новых медицинских технологий», г. Пермь), основным компонентом которого является чело-

веческий  $\alpha$ -фетопроtein, лиофилизированный и стабилизированный декстраном.

**Выделение мононуклеарных лейкоцитов периферической крови (МЛПК).** МЛПК выделяли из стабилизированной гепарином (25 ЕД/мл) периферической крови 15 здоровых доноров на одноступенчатом градиенте фикола (Pharmacia, США, плотностью 1,077 г/см<sup>3</sup>) центрифугированием при 400 g в течение 30 минут. Мононуклеарные лейкоциты, образовавшие интерфазное кольцо, собирали пипеткой и трехкратно отмывали в среде 199 (Институт полиомиелита и вирусных энцефалитов РАМН, Москва). После каждой отмывки в 10-кратном объеме среды клетки осаждали центрифугированием при 200 g.

МЛПК доноров культивировали в течение 2 суток в полной культуральной среде, включающей RPMI-1640 (Sigma, США) с добавлением 10% эмбриональной телячьей сыворотки, 2 mM глутамина, стрептомицина с пенициллином по 5000 ME/мл и содержащей 2 мкг/мл исследуемых иммуномодуляторов.

Функциональную активность МЛПК доноров определяли в цитотоксическом тесте (МТТ) [19] на линии NK-чувствительных опухолевых клеток K-562 (эритробластный лейкоз человека) при культивировании их с интактными и активированными МЛ в течение 18 часов при 37 °C и 4% CO<sub>2</sub> в различных соотношениях (1:5, 1:2, 1:1). Флюоресценцию клеток измеряли на флюориметре Multisk an-Plus (Labsystems, Финляндия) при длине волны возбуждения 540 нм и определяли процент лизиса опухолевых клеток (процент цитотоксичности). Среднеэффективное соотношение клетки мишени/эффекторы (ЭС50), при котором отмечается лизис 50% опухолевых клеток, рассчитывали при помощи программы Biostat.

Иммунофенотип мононуклеарных лейкоцитов периферической крови доноров оценивали при помощи проточного цитометра FacsCalibur (Becton Dickinson, США) с применением моноклональных антител против соответствующих антигенов. Клетки отмывали холодным фосфатно-солевым буфером (ФСБ) и окрашивали FITC (флюоресцинизотиоционат) и PE (фикоэритрин) – мечеными антителами согласно инструкции производителя. На клетках, полученных из мононуклеаров периферической крови доноров, исследовали уровни экспрессии молекул CD3, CD4, CD8, CD16, CD25, CD38, CD56, CD57, CD58 и HLA-DR, а также дифференцировочных антигенов с использованием двойной метки CD3-FITC и CD16-PE.

Гейт (окно) популяции клеток устанавливали на основе комбинации прямого и бокового светорассеяния и размера клеток. При учете результатов подсчитывали 10 000 клеток в гейте.

Статистическая обработка материала проведена при помощи программного пакета WIN MDI 2.8.

Статистическую обработку данных проводили при использовании t-критерия Стьюдента, используя стандартный пакет статистических программ Windows 2003 (StatSoft 6.0).

## Результаты

В экспериментах была изучена способность иммуномодуляторов: бактериального (Иммуновак-ВП-4) и эукариотического (профеталь) происхождения к индукции киллерной активности мононуклеарных лейкоцитов. Исследование иммунофенотипа показало, что добавление в среду культивирования МЛПК этих иммуномодуляторов способствовало увеличению количества клеток, экспрессирующих поверхностные антигены цитотоксических лимфоцитов и НК-клеток (табл. 1). Значительное количество мононуклеарных лейкоцитов периферической крови, инкубированных с исследуемыми препаратами, экспрессировали на своей поверхности активационные антигены – CD38 и HLA-DR. Данные клетки также характеризовались высоким уровнем экспрессии маркеров натральных киллеров – CD56, CD16 и высоким процентным содержанием CD8<sup>+</sup> клеток по сравнению с интактными МЛПК. Количество CD8<sup>+</sup>, CD16<sup>+</sup>, CD38<sup>+</sup>, CD56<sup>+</sup>, HLA-DR<sup>+</sup> клеток при инкубации МЛ с иммуномодуляторами повышалось в среднем в 1,5 раза по сравнению с контролем. Результаты экспериментов продемонстрировали умеренное повышение (по сравнению с контрольной

группой) количества CD3<sup>+</sup> и CD4<sup>+</sup> Т-клеток в популяции мононуклеаров.

Лимфоциты, выделенные из периферической крови доноров, образуют две субпопуляции, в одной из которых обнаруживались практически только Т-лимфоциты (41%), а в другой – НК (17%). Содержание НКТ, несущих одновременно маркеры Т-клеток и НК, в обеих исследованных субпопуляциях колебалось от 1,5 до 3%. Под воздействием Иммуновак-ВП-4 и препарата профеталь количество НКТ в популяции лимфоцитов увеличивалось до 6,5 и 7,2% соответственно (рис. 1). Как следует из полученных данных, степень воздействия иммуномодуляторов ВП-4 и профеталь на мононуклеарные лейкоциты была сопоставимой.

Цитотоксическая активность МЛПК доноров по отношению к НК-чувствительной линии опухолевых клеток К-562 повышалась при увеличении соотношения опухолевых и эффекторных клеток (табл. 2). При соотношении 1:5 Иммуновак-ВП-4 усиливал цитотоксичность эффекторных клеток в 3,6 раза, профеталь – в 3,2 раза по сравнению с неактивированными МЛПК. Таким образом, оба препарата практически в одинаковой степени обладали выраженным противоопухолевым действием *in vitro*.

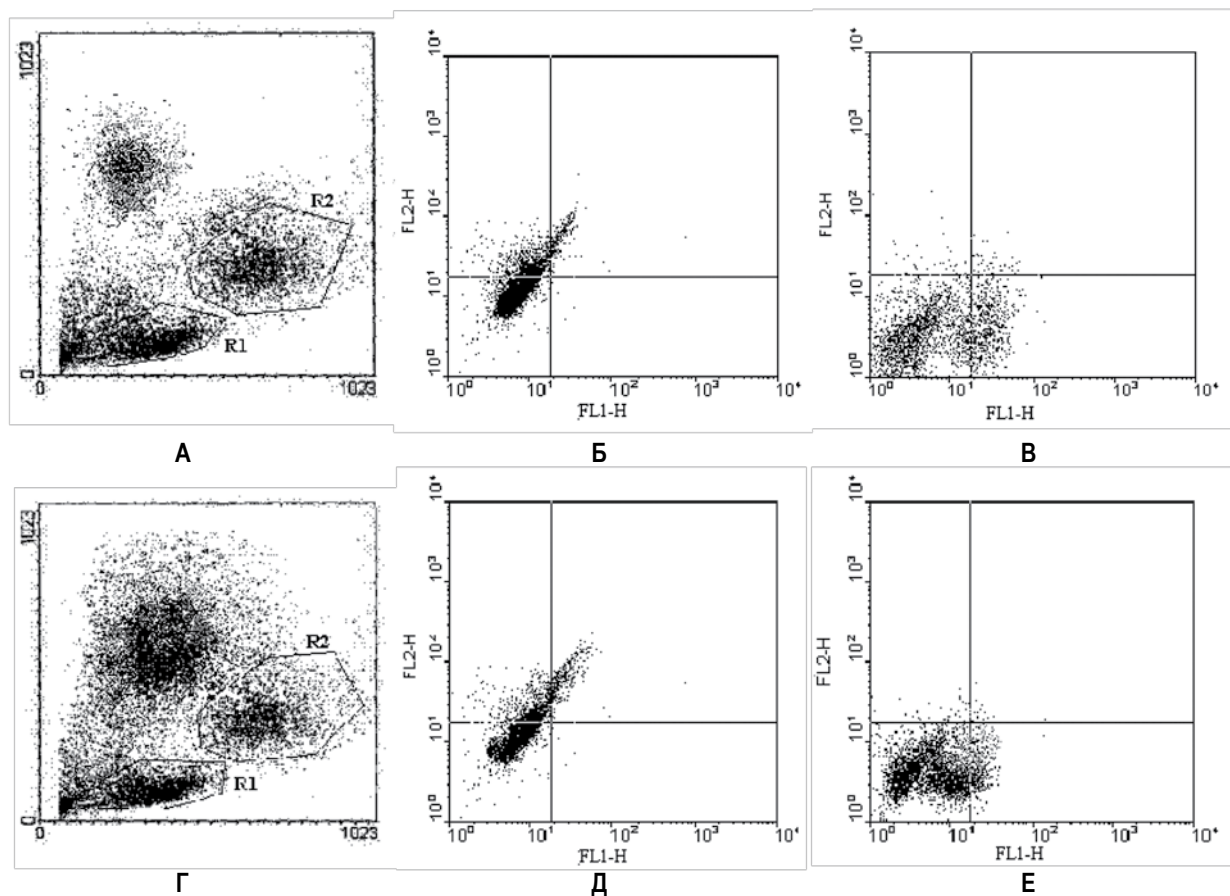
## Обсуждение

В результате исследований выявлено, что иммуномодуляторы микробного происхождения Иммуновак-ВП-4 и препарат профеталь, содержащий в качестве основного компонента человеческий  $\alpha$ -фетопроtein, значительно повышают

**ТАБЛИЦА 1. ВЛИЯНИЕ ИММУНОМОДУЛЯТОРОВ ИММУНОВАК-ВП-4 И ПРЕПАРАТА ПРОФЕТАЛЬ НА ИММУНОФЕНОТИП МОНОНУКЛЕАРНЫХ ЛЕЙКОЦИТОВ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ ЗДОРОВЫХ ДОНОРОВ**

Показатели	Иммунофенотип МЛПК, %		
	МЛПК	МЛПК + ВП-4	МЛПК + профеталь
CD3	41,25±2,8	58,6±3,2*	60,6±3,3*
CD4	23,6±1,2	38,9±3,1*	35,5±2,3*
CD8	31,2±2,4	51,3±3,6*	47,4±3,1*
CD16	17,8±2,8	29,6±3,7	30,1±3,3
CD25	7,7±0,7	23,7±2,3*	11,5±0,3
CD38	27,8±2,1	51,3±2,3*	59,2±4,5*
CD56	10,3±0,3	53,8±3,6*	57,7±3,8*
CD57	20,3±1,4	33,8±2,5*	29,5±1,5*
CD58	31,5±2,6	56,4±2,3*	41,3±1,7*
HLA-DR	11,8±2,3	48,7±3,5*	55,2±2,1*
CD3/CD16	3,2±0,3	6,5±0,2*	7,2±0,4*

**Примечание.** \* – статистически значимые различия ( $P < 0,05$ ) по t-критерию Стьюдента для сопряженных пар признаков по сравнению с МЛПК.



**Рисунок 1.** Цитофлюорограмма, характеризующая экспрессию поверхностных молекул CD3 (FITC), CD16 (PE) МЛПК доноров, активированных Иммуновак-ВП-4 (А-В) и препаратом профеталь (Г-Е) (2 мкг/мл)

**Примечание.**

- А – распределение МЛПК доноров при культивировании с Иммуновак-ВП-4 (72 ч).
- Б – распределение МЛПК при двойном окрашивании (CD3/CD16) в регионе R2.
- В – распределение МЛПК при двойном окрашивании (CD3/CD16) в регионе R1.
- Г – распределение МЛПК доноров при культивировании с препаратом профеталь (72 ч).
- Д – распределение МЛПК при двойном окрашивании (CD3/CD16) в регионе R2.
- Е – распределение МЛПК при двойном окрашивании (CD3/CD16) в регионе R1.

**ТАБЛИЦА 2.** ВЛИЯНИЕ ИММУНОМОДУЛЯТОРОВ ИММУНОВАК-ВП-4 И ПРОФЕТАЛЬ НА НК-АКТИВНОСТЬ МОНОНУКЛЕАРНЫХ ЛЕЙКОЦИТОВ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ ЗДОРОВЫХ ДОНОРОВ К КЛЕТКАМ ОПУХОЛЕВОЙ ЛИНИИ К 562, %

Соотношение клеток К 562 к МЛПК доноров (мишень/эффектор)	Процент лизиса опухолевых клеток		
	МЛПК	МЛПК + ВП-4	МЛПК + профеталь
1:5	24,4±5,0	89,3±3,5*	78,5±4,8*
1:2	20,2±4,1	70,5±5,2*	67,6±6,1*
1:1	18,1±1,2	45,3±3,7*	47,2±2,5*

**Примечание.** \* – статистически значимые различия (P < 0,05) по t-критерию Стьюдента для сопряженных пар признаков по сравнению с МЛПК.

функциональную активность мононуклеарных лейкоцитов периферической крови человека. Высокий уровень цитотоксической активности МЛ, активированных этими препаратами, обусловлен, очевидно, одновременной индукцией цитотоксических лимфоцитов (ЦТЛ) – CD8<sup>+</sup> и натуральных киллеров (НК) – CD16<sup>+</sup>, CD56<sup>+</sup> клеток. Как было отмечено в наших предыдущих исследованиях, механизм действия препарата профеталь отличает его от IL-2, вызывающего, главным образом, генерацию НК-подобных ЛАК-клеток [3, 5]. Активация МЛ под действием иммуномодуляторов Иммуновак-ВП-4 и профеталь подтверждается также усилением экспрессии активационных и адгезивных молекул (CD38, CD56, CD58, HLA-DR) на их поверхности.

В литературе имеются данные о существовании в популяции активированных лимфоцитов наряду с ЦТЛ и НК натуральных киллеров Т-клеток (НКТ), экспрессирующих не только маркеры НК (CD16, CD56), но и Т-клеточные дифференцировочные антигены (CD3, CD4, CD8) [7, 16]. Эта субпопуляция лимфоцитов обнаруживается в основном при инфекционном процессе в печени и легких, но практически отсутствует в периферической крови [14]. При активации МЛПК исследуемыми иммуномодуляторами увеличивается содержание двойных позитивных клеток (CD3/CD16), что позволяет отнести их к популяции НКТ. Эти данные подтверждаются усилением цитотоксических свойств активированных клеток, поскольку по своей спонтанной киллерной активности НКТ значительно превышают МЛ и не уступают в этом отношении ЛАК.

Таким образом, проведенные исследования показали, что исследуемые иммуномодуляторы Иммуновак-ВП-4 и профеталь индуцируют активацию киллерных свойств мононуклеаров, которые при этом приобретают свойственный им фенотип.

Эти данные свидетельствуют о возможности использования данных препаратов для экстракорпоральной генерации активированных лимфоцитов, которые могут применяться в иммунотерапии злокачественных новообразований и инфекционных заболеваний наряду с традиционными ЛАК-клетками, полученными при инкубации мононуклеарных лейкоцитов с IL-2.

## Список литературы

1. Ахматова Н.К. Изменение функциональной активности дендритных клеток, генерированных из клеток костного мозга мышей, под воздействием иммуномодулятора микробного происхождения // Цитокины и воспаление. – 2007. – Т. 6, № 1. – С. 20-24.
2. Давыдов М.И., Нормантович В.А., Киселевский М.В., Волков С.М. Адоптивная иммунотерапия при опухолевых плевритах: клинико-лабораторное исследование // Российский онкологический журнал. – 2000. – № 6. – С. 14-17.
3. Лебединская О.В., Велижева Н.П., Доненко Ф.В., Черешнев В.А., Родионов С.Ю., Ахматова Н.К., Шубина И.Ж., Лебединская Е.А., Киселевский М.В. Влияние препарата профеталь на дифференцировку и функциональную активность мононуклеарных лейкоцитов человека // Клеточные технологии в биологии и медицине. – 2006. – № 2. – С. 108-117.
4. Черешнев В.А., Родионов С.Ю., Черкасов В.А., Малютина Н.Н., Орлов В.А. Альфа-фетопротеин. – Екатеринбург: УрО РАН, 2004. – С. 376.
5. Черешнев В.А., Лебединская О.В., Родионов С.Ю., Ахматова Н.К., Шубина И.Ж., Лебединская Е.А., Гаврилова Т.В., Киселевский М.В. Влияние препарата «Профеталь» на функциональную активность мононуклеарных лейкоцитов и дендритных клеток человека // Медицинская иммунология. – 2005. – Т. 7, № 5-6. – С. 525-534.
6. Arase N., Arase H., Hirano S., Yokosuka T., Sakurai D., Satito T. IgE-mediated activation of NK cells through Fc gamma RIII // J. Immunol. – 2003. – Vol. 15, N 6. – P. 3054-3058.
7. Bhardwaj N. Harnessing the immune system to treat cancer // J. Clin. Invest. – 2007. – Vol. 117, (5). – P. 1130-1136.
8. Dudich E.I. Dudich E.I., Semenkova L.N., Dudich I.V. et al. Alpha-fetoprotein-induced apoptosis of cancer cells // Bull. Biol. Med. – 2000. – Vol. 130, N 12. – P. 1127-1133.
9. Foss F.M. Immunologic mechanisms of antitumor activity // Semin. Oncol. – 2002. – Vol. 29. – P. 5-11.
10. Galandrini R., Tassi I., Mattia G., Lenti L., Piccoli M., Frati L., Santoni A. SH2-containing inositol phosphatase (SHIP-1) transiently translocates to raft domains and modulates CD16-mediated cytotoxicity in human NK cells // Blood. – 2002. – Vol. 15, N 13. – P. 4581-4589.
11. Hook C., Telyatnikova N., Goodall J. Braud V., Carmichael A., Wills M. Effects of Chlamydia trachomatis infection on the expression of natural killer (NK) cell ligands and susceptibility to NK cell lysis // Clin. Exp. Immunol. – 2004. – Vol. 138, N 1. – P. 54-60.
12. Ikeda H., Chamoto K., Tsuji T., Suzuki Y., Wakita D., Takeshima T., Nishimura T. The critical role of type-1 innate and acquired immunity in tumor immunotherapy // Cancer Sci. – 2004. – Vol. 95, N 9. – P. 697-703.

13. Mullbacher A. Cell-mediated cytotoxicity in recovery from poxvirus infections // *Rev. Med. Virol.* – 2003. – Vol. 13, N 4. – P. 223-232.

14. Nakagawa R., Nagafune I., Tazunoki Y. Mechanisms of the antimetastatic effect in the liver and of the hepatocyte injury induced by  $\alpha$ -galactosylceramide in mice // *The Journal of Immunology.* – 2003. – Vol. 166 (11). – P. 6578-6584.

15. Narazona R., Casado J., Delarosa O., Torre-Cisneros J., Villanueva J., Sanchez B., Galiana M. Selective depletion of CD56(dim) NK cell subsets and maintenance of CD56(bright) NK cells in treatment-naïve HIV-1-seropositive individuals // *J. Clin. Immunol.* – 2002. – Vol. 22, N 3. – P. 176-183.

16. Pillai A.B., George T.I., Dutt S., Teo P., Strober S. Host NKT Cells Can Prevent Graft-versus-Host Disease and Permit Graft Antitumor Activity after Bone Marrow Transplantation // *J. Immunol.* – 2007. – Vol. 178 (10). – P. 6242-6251.

17. Taga K., Yamauchi A., Bloom E. Target cell-induced apoptosis in IL-2-activated human natural killer cells // *Leuk. Lymphoma.* – 1999. – Vol. 32, N. 5. – P. 451-458.

18. Yamaguchi Y., Ohshita A., Kawabuchi Y., Ohta K., Shimizu K., Minami K., Hihara J. Adoptive immunotherapy of cancer using activated autologous lymphocytes-current status and new strategies // *Hum. Cell.* – 2006. – Vol. 16, N 4. – P. 183-189.

19. Zund G., Ye Q., Hoerstrup S.P. Tissue engineering in cardiovascular surgery: MTT, a rapid and reliable quantitative method to assess the optimal human cell seeding on polymeric meshes // *Eur. J. Cardiothorac. Surg.* – 1999. – Vol. 15, N 4. – P. 519-524.

*поступила в редакцию 07.07.2008*

*отправлена на доработку 25.10.2008*

*принята к печати 25.12.2008*