

Vplyv polyoxidónia na vybrané parametre špecifickej celulárnej a humorálnej imunity *in vitro*

Adriana. Tomaškovičová ^a, František. Gazdík ^b, Katarína. Gazdíkova ^b

^a Katedra biotechnológií, Fakulta prírodných vied Univerzity sv. Cyrila a Metoda v Trnave, Nám. J. Herdu 2,
917 01 Trnava

^b Oddelenie klinickej imunológie, Ústav preventívnej a klinickej medicíny, Limbova 15, 833 01 Bratislava

Súhrn: Polyoxidónium, derivát N-oxidu polyetylénpiperezínu je novovyvinutý imunopreparát s predpokladanými imunostimulačnými účinkami. Cieľom štúdie bolo stanoviť *in vitro* vplyv Polyoxidónia na expresiu aktivačných markerov periférnych lymfocytov a na produkciu imunoglobulínov. Na experimenty sa použila venózna krv od 19 dobrovoľníkov (3 ženy a 16 mužov) s priemerným vekom 27 rokov. Aktivačné markery sa stanovovali monoklonovými protilátkami s využitím prietokovej cytometrie (Coulter Epics XL). Produkcia imunoglobulínov triedy G a M sa stanovovala ELISA metódou.

Polyoxidónium v koncentráciách 1, 10 a 100 ug/ml spolu s PHA vykazovalo štatisticky signifikantne zníženú expresiu aktivačného markeru CD71 na cytotoxických, respektíve supresorových T lymfocytoch (CD8+ T lymfocyty), ($p=0.002$) a *in vitro* zvyšovalo produkciu imunoglobulínu triedy M pri všetkých testovaných koncentráciách ($p=0.004$). Testovaný prípravok *in vitro* vykazoval imunomodulačný účinok na vybrané parametre špecifickej celulárnej a humorálnej imunity.

Kľúčové slová: polyoxidónium, imunomodulátor, *in vitro*, aktivačné markery, CD4+ T lymfocyty, CD8 + T lymfocyty, produkcia imunoglobulínov M a G

Úvod

Antibiotiká sú už desaťročia nezastupiteľnou skupinou liečiv v boji proti infekciám. V poslednom desaťročí farmaceutické firmy v dôsledku nárastu rezistencie mikrobov na antibiotiká, zapríčinenej aj nesprávnou indikáciou v terénnej praxi, sú nútené vyvíjať nové prípravky s antimikrobiálnou aktivitou. Vývoj tejto skupiny liekov je spojený s vysokými finančnými nákladmi, ktoré sa potom premietajú vo zvýšenej cene nového antibiotika. Vzniká akýsi bludný kruh charakterizovaný vznikom rezistencie na antibiotiká v relatívne krátkom čase a potrebou vývoja nových finančne nákladnejších antimikrobiálnych prípravkov.

Perspektívnym riešením v tejto oblasti je vývoj imunopreparátov. Postupne sa vo väčšom rozsahu začínajú v medicínskej praxi uplatňovať lieky s imunostimulačnými účinkami - *imunostimulanciá*. Preventívne podávanie imunostimulancií aktivuje mechanizmy celulárnej a humorálnej imunity do takej miery, že klinicky zabránia manifestácii infekcie. Imunostimulanciá sú perspektívnou skupinou liečiv, ktoré sú indikované predovšetkým u chronických a recidivujúcich infekcií. Imunostimulanciá podľa pôvodu a chemickej štruktúry sú heterogénnou skupinou. Do skupiny imunostimulancií s definovanou chemickou

štruktúrou patrí aj Polyoxidónium (P), derivát N – oxidu polyetylénpiperezínu, vysokomolekulárna zlúčenina (polymér). Polyoxidónium je novovivynutý prípravok ruskou farmaceutickou firmou Imapharma s predpokladanými imunostimulačnými účinkami na oblasť humorálnej a bunkovej imunity.

Cieľom štúdie bolo stanoviť *in vitro* vplyv P na vybrané funkčné parametre špecifickej imunity - expresiu aktivačných markerov na periférnych T lymfocytoch a na produkciu (tvorbu) imunoglobulínov (Ig).

Pacienti a metódy

Charakteristika súboru

Súbor tvorilo 19 zdravých dobrovoľníkov oboch pohlaví (3 ženy a 16 muží) s priemerným vekom 27 rokov, ktorí klinicky neudávali žiadne subjektívne ťažkosti. Od každého dobrovoľníka bol obdržaný podpísaný „Informovaný súhlas“.

Metódy

Od každého zaradeného jedinca sa z kubitálnej žily odobralo 8 ml krvi, ktorá sa použila na jednotlivé experimenty *in vitro*.

Aktivačné markery lymfocytov

Vzorky krvi boli pridané do rastového média RPMI 1640 v pomere 1:1. RPMI 1640 bolo obohatené 10% hovädzím sérovým albumínom. Do 180 µl takto nariadenej krvi bol pridaný fytohemaglutinín-P (PHA-P) v koncentrácii 20 µg/ml a P v koncentráciách 1, 10 a 100 µg/ml. Mikrotitrová platnička bola inkubovaná pri 37° C a v 5% atmosfére CO₂. Po 24 hodinách kultivácie bola analyzovaná expresia CD69, po 48 hodinách CD25 a po 72 hodinách CD71. Fenotypová analýza bola uskutočnená za použitia dvojfarebnej prietokovej cytometrie (Coulter Epics XL) pomocou monoklonových protilátok anti-CD4, anti-CD8, anti-CD69, anti-CD25 a anti-CD71.

Produkcia IgG a IgM B lymfocytmi

Inkubácia periférnych lymfocytov (PBMC – peripheral blood mononuclear cells) a produkcia IgG a IgM sa vykonala podľa modifikovanej metódy JAHNOVEJ a kol. (1994). Po izolácii PBMC (10^6 bunky/ml v 0,25 ml) boli inkubované v rastovom médiu RPMI 1640 (BioWhittaker, Belgicko) spolu s pokeweed mitogénom (PWM - špecifický mitogén pre B lymfocyty, Sigma) v pomere 2 $\mu\text{g/ml}$ a s P v koncentráciách 1, 10 a 100 $\mu\text{g/ml}$ po dobu 7 dní pri 37°C a 5% CO_2 . Produkcia Ig sa stanovila ELISA metódou (JAHNOVA a kol., 1994).

Výsledky

Expresia aktivačných markerov na T lymfocytoch

Zaznamenalo sa signifikantné zníženie expresie aktivačného markera CD71 na CD8+ bunkách (cytotoxické a supresorové T lymfocyty) pri všetkých sledovaných koncentráciách P ($p=0,002$), (Tab. 1). V ostatných sledovaných parametroch sa nezaznamenali signifikantné zmeny.

Produkcia IgG a IgM po stimulácii PWM a polyoxidóniom

Zaznamenalo sa signifikantné zvýšenie produkcie Ig triedy M po stimulácii P vo všetkých sledovaných koncentráciách 1, 10 a 100 $\mu\text{g/ml}$ ($p=0,01$, $p=0,004$, $p=0,004$), (Tab. 2).

Diskusia

V experimentoch *in vitro* s použitím venóznej krvi zdravých dobrovoľníkov sa sledoval účinok P na vybrané funkčné parametre špecifickej bunkovej a humorálnej imunity. Po inkubácii plnej krvi s PHA spolu s P štatisticky významne poklesla expresia znaku CD71 na CD8+ T lymfocytoch, ostatné znaky CD69 a CD25 sa signifikantne na subpopuláciách CD4+ a CD8+ nemenili. CD71 marker je súčasťou transferínového receptora a je exprimovaný na všetkých proliferujúcich bunkách a aktivovaných leukocytoch. CD8+ T lymfocyty patria do kategórie supresorových a cytotoxických T lymfocytov. Cytotoxické T lymfocyty sú súčasťou efektorových mechanizmov protinádorovej a protivírusovej imunity. Znížená expresia znaku

Tab. 1: Expressia aktivačných markerov po stimulácií PHA-P (%) (n=19)

Parameter %	Koncentrácia $\mu\text{g/ml}$				Významnosť P<
	PHA	1	10	100	
CD69					
CD4/CD69	75,84	75,21	75,57	76	NS
SEM	2,09	2,06	1,22	1,55	
CD8/CD69	65,73	66,63	65,42	64,89	NS
SEM	2,33	2,91	2,78	2,96	
CD25					
CD4/CD25	52,05	53,57	54,78	53,78	NS
SEM	4,65	4,9	5,04	4,64	
CD8/CD25	40,64	45,94	45,94	44,36	NS
SEM	3,08	3,5	3,62	3,44	
CD71					
CD4/CD71	43,25	41,25	43,43	42,12	NS
SEM	3,6	4,59	4,1	4,16	
CD8/CD71	45,31	31,18	37,68	32,37	a,b, c=0,002
SEM	2,3	3,3	3,44	2,89	

Vysvetlivky: NS - nesignifikantný, CD - diferenciačný antigén, SEM - stredná chyba priemeru, a - koncentrácia P 1 $\mu\text{g/ml}$, b - koncentrácia P 10 $\mu\text{g/ml}$, c - koncentrácia P 100 $\mu\text{g/ml}$

Tab. 2: Produkcia imunoglobulínov triedy G a M in vitro po stimulácií PWM (n=16)

Parameter	PWM	Koncentrácia $\mu\text{g/ml}$			Významnosť P<
		1	10	100	
IgG/ng/ml/ SEM	562,7 69,5	2257 1168	5428 2021	4383 1935	NS
IgM/ng/ml/ SEM	1756 451	6197 3159	5502 2118	7990 3404	a - 0,01 b,c - 0,004

Vysvetlivky: IgG - imunoglobulín G, IgM - imunoglobulín M, PWM - pokeweed mitogén

CD71 na CD8+ T lymfocytoch po inkubácií P s PHA by v klinickej situácií recidivujúcej vírusovej infekcie bola skôr nepriaznivým faktorom. Možno predpokladať, že v priebehu vírusovej infekcie je žiaduca proliferačná aktivácia CD8+ T lymfocytov, ukazovateľom čoho je expresia znaku CD71 (zvyšená expresia na proliferujúcich bunkách). Pri interpretácií

výsledkov tohto experimentu, ale treba mať na zreteli, že sa v experimente použila venózna krv zdravých jedincov. Z dostupných literárnych zdrojov dokumentované na zvieracích modeloch ako aj v klinickej humánnej medicíne P má širší imunomodulačný účinok. Cieľovými štruktúrami sú predovšetkým bunky prirodzenej imunity - fagocyty a prirodzené zabijáče (NK), ktorých funkciu P zvyšuje (stimuluje) (PETROV a kol., 2000; CHERESHNEV a kol., 2000). Imunostimulačný účinok P na fagocytovú aktivitu ľudských periférnych leukocytov (testovaná mikrobicídna aktivita voči *Staphylococcus aureus*) bol demonštrovaný u zdravých ako aj chorých jedincov s granulomatóznou chorobou (DAMBAEVA a kol., 2003).

Pozitívny klinický účinok P u pacientov s chronickou bronchitídou a chronickou rekurentnou furunkulózou. Jeho účinok sa prejavil predovšetkým v oblasti zvýšenia fagocytovej aktivity (BORISOVA a kol., 1998).

Informácie o expresii aktivačných markeroch na T lymfocytoch účinkom P v anglosaskej literatúre doposiaľ nie sú publikované.

Druhým funkčným vyšetrením bolo stanovenie vplyvu P na tvorbu Ig triedy G a M. Izolované lymfocyty po inkubácii s P (vo všetkých testovaných koncentráciách) s PWM signifikantne zvýšili tvorbu IgM, zatiaľ čo tvorba IgG nebola signifikantne ovplyvnená. Tento fenomén z hľadiska antiinfekčnej (antibakteriálnej a antivírusovej) imunity možno považovať za pozitívny. Imunoglobulíny triedy M patria medzi dôležité efektorové mechanizmy špecifickej humorálnej imunity (proces opsonizácie, vírus neutralizačná aktivita atď.).

Imunostimulačný účinok P na tvorbu imunoglobulínov u pacientov s humorálnym deficitom. (PETROV a kol., 2000) Signifikantný účinok P na indukciu imunitnej odpovede u geriatrických jedincov (signifikantné zvýšenie titra protilátok proti kmeňom A a B chrípky) sa pozoroval v kombinácii s vakcínou proti chrípke (Grippol) (BURTSEVA a kol., 2000). Profylaktický účinok kombinovanej vakcíny proti chrípke (Grippol spolu s P) sa preukázal významne aj u detí (EL'SHINA a kol., 2000). Tieto klinické štúdie dokumentujú benefit P v kombinovanej vakcíne proti chrípke prejavujúci zvýšenou idnikciou tvorby protilátok v porovnaní so sólo vakcínou.

Závery

V testoch *in vitro* P v koncentráciách 1, 10 a 100 µg/ml spolu s PHA vykazoval zníženú expresiu aktivačného markeru CD71 na cytotoxických, respektíve supresorových T

lymfocytoch (CD8+ T lymfocyty). Tento marker je súčasťou transferínového receptora a je exprimovaný na všetkých proliferujúcich bunkách a aktivovaných leukocytoch.

Polyoxidónium *in vitro* zvyšuje produkciu Ig triedy M pri všetkých testovaných koncentráciách. Polyoxidónium v testoch *in vitro* s použitím biologického materiálu zdravých jedincov (venózna krv) vykazoval na vybrané parametre špecifickej celulárnej a humorálnej imunity imunomodulačný účinok.

V ďalších etapách je potrebné pokračovať v sledovaní účinkov P na molekulovej úrovni ako aj na úrovni klinického vyhodnotenia pacientov, najvhodnejšie formou kontrolovaných klinicko-imunologických štúdií.

Literatúra

BORISOVA, A.M., LAKTIONOVA, L.V., SETDIKOVA, N.K.: Clinical trial of domestic drug polyoxidonium in secondary immunodeficiency. *Ter. Arkh.*, 70, 1998, s. 52-7.

BURTSEVA, E.I., SLEPUSHKIN, A.N., VLASOVA, L.N.: Comparative evaluation of reactogenicity and immunogenicity of inactivated influenza vaccines in the elderly. (Article in Russian) *Zh. Mikrobiol. Epidemiol Immunobiol.*, 5, 2000, s. 40-45.

DAMBAEVA, S.V., MAZUROV, D.V., GOLUBEVA, N.M.: The effect of polyoxidonium, a novel immunomodulator, on the phagocytic activity of human peripheral blood leukocytes. *Immunol. Lett.*, 87, 2003, s. 39.

EL'SHINA, G.A., GORBUNOV, M.A., BEKTIMIROV, T.A.: The evaluation of reactogenicity. Harmlessness and prophylactic Efficacy of gripol trivalent polymer-subunit influenza vaccine administered to schoolchildren (Article in Russian) *Zh. Mikrobiol. Immunobiol.*, 2, 2000, s. 50-54.

CHERESHNEV, V.A., SHILOV, Y.I., CHERESHNEVA, M.V.: Effects of Polyoxidonium on phagocytic cell functions. Experimental and clinical estimation of potential inclusion of Polyoxidonium in complex therapy in penetrating eye injury. *Russian J. Immunol.*, 5, 2000, s. 40-52.

JAHNOVÁ, E., FERENČÍK, M., NYULASSY, S.: Amphiphilic detergents inhibit production of IgG and IgM by human peripheral blood mononuclear cells. *Immunol. Lett.* 1994, s. 71-75.

PETROV, R.V, KHAITOV, R.M., NEKRASOV, A.V.: Polyoxidonium- a drug of a new generation of immunomodulators with known structure and mechanism of action. *Immunol. Lett.*, 5, 2000, s. 24.

The effect of polyoxidonium on selected parameters of specific cellular and humoral immunity (*in vitro*)

Abstract: Polyoxidonium, high molecular compound - polymer (N - oxidized polyethylene-piperazine derivative) represents new developed immunomodulator with expected immunostimulatory effects. The aim of the study was to assess *in vitro* the influence of Polyoxidonium on the expression of lymphocyte activation markers and the production of immunoglobulins. The experiments *in vitro* were performed using venous blood obtained from healthy volunteers (16 subjects, 3 females, 13 males, average age 27 years). Phenotypical analysis of activation markers on lymphocytes was determined by specific monoclonal antibodies using two-colour flow cytometry after previous incubation with PHA and polyoxionium (range of concentration 1, 10, 100 µg/ml). Production of immunoglobulins was performed according to the modified method of Jahnova et al. 1994. Incubation of whole blood with Polyoxidonium in concentrations 1, 10 a 100 µg/ml together with PHA (T lymphocytes mitogen) exerted statistical significance in reduced expression of CD71 marker determined on CD8+ T lymphocytes (p=0.002). Polyoxidonium *in vitro* increased production of IgM in all tested concentrations (p=0.004), while the production of IgG did not change significantly. Tested preparation *in vitro* experiments exerted on the selected parameters of specific cellular and humoral immunity immunomodulatory effects.

Key words: polyoxidonium, immunomodulator, *in vitro*, markers of activation, CD4+ T lymphocytes, CD8+ lymphocytes, production of immunoglobulin G and M