

## **MEANS AND MECHANISMS OF POLYOXIDONIUM ACTION**

Kulakov V.V., Karimova I.M., Klimova S.V.,

### **Vplyv polyoxidonia na cytotoxickú aktivitu neutrofilov a mononukleárov periférnej krvi človeka.**

ŠVÚ - Inštitút imunológie MZ RF, Moskva

Centrálny vedecko výskumný, kožno - venerologický inštitút MZ RF, Moskva

Prirodzené killery (NK - bunky) predstavujú 3% mononukleárnych buniek a majú morfológiu granulárnych lymfocytov (priemer 16 - 20  $\mu\text{m}$ ), [9]. Dôležitým principiálnym odlišením NK od cytotoxických T - lymfocytov je ich schopnosť aktívne lýzovať jednak cudzorodé bunky v antigénnom vzťahu (nádorové a nenádorové bunky), tak i normálne bunky človeka a zvierat pri poškodení ich diferenciácie bez predbežnej senzibilizácie. Signálom pre autoagresiu NK - buniek slúži zosilnenie syntézy v konečných (zrelých) tkaní niektorých normálnych bunkových antigénov „ nie k času „ (embryonálne antigény) alebo „ nie k miestu „ (heteroorganové antigény , isoenzými), [10]. NK - bunky nielen demonštrujú killernu aktivitu vo vzťahu k vlastným bunkám s narušenou diferenciáciou, ale aj prejavujú regulačný vplyv na biosyntetické procesy v nich, s cieľom návratu k normálnej hladine cytodiferenciácie. Veľkú úlohu NK - bunky zohrávajú v regulačných procesoch proliferácie a diferenciácie kmeňových krvotvorných buniek kostnej drene.

Pri eliminácii nádorových buniek z organizmu sa zúčastňujú nielen prirodzené killery, ako to bolo do nedávna zaužívané, ale aj neutrofilly [3]. Pre uskutočnenie cytotoxického efektu fagocyty musia byť aktivované cytokínmi, ktoré sú produkované inými bunkami (T -lymfocyty, prirodzené killery ), hoci existujú údaje o prítomnosti u nich spontánnej cytotoxicity. Killing nevzniká vlastne fagocytózou, tak ako je to u makrofagov alebo granulocytov, ktoré nepohlujú objekt, ale vzájomným spolupôsobením pomocou bunkových receptorov , čo vedie k zániku terča [4].

Cieľom tohto výskumu je štúdium vplyvu Polyoxidonia na cytotoxickú aktivitu skutočných killerov a neutrofilov zdravých darcov (donorov) a pacientov majúcich nádor.

#### **Metodika výskumu.**

Heparinizovaná krv (10 jed./ml) bola získaná od 9 - tich normálnych darcov a 7 – mich chorých s rôznymi štádiami rakoviny pľúc. Separáciu mononukleárov (MNB) sme urobili pomocou jednostupňového gradientu hustoty Ficoll - Pague (Pharmacia) podľa metódy Boyum [5]. Prežívanie buniek po separácii predstavovalo 89%; tu sme hodnotili s použitím tripanovej modrej (Serva). MNB sme resuspendovali v plnom kultúrnom prostredí (PKP), ( RPMI – 1640 ) s pridaním 10% inaktivovaného embryonálneho teľacieho séra (ETS), 10mM HEPES - pufru (oba Flow), 2mM L -

glutamínu ( Inštitút Polyomyelitídy a Vírusových Encefalitíd RAMN ) a 40 µg/ml gentamycínu (Pharmacia) v koncentracii 5 mln./ml. Neutrofilý (NF) sa separovali podľa metodiky opísanej v [1]. NF sa resuspendovali v PKP do koncentracie 5mln./ml. Získané dárcovské mononukleary a neutrofilý sme rozdelili na dve časti: jedná časť zostala neaktivovaná (ako kontrola) a druhá - sa aktivovala v priebehu troch hodín s polyoxidoniom v dávke 1 µg/ml, 50 µg/ml a 100 µg/ml v CO<sub>2</sub> - inkubátore pri teplote 37 °C. Po skončení inkubácie neaktivované i aktivované bunky sa usádzali a dvakrát premývali v prostredí 199. Po premytí sa bunky resuspendovali do koncentracie 5 mln./ml v PKP. Kvalitatívnym terčom v práci bola použitá ľudská erytromyeloidna línia K - 562 [10]. Na výskum sa brali bunky až na druhý deň po presiatí, čím sa dosiahla koncentrácia 600 - 700 tisíc v 1 ml.

### **Cytotoxický test.**

Terčiky (2mln./ml) sme inkubovali pri 37 °C v atmosfére 5% CO<sub>2</sub> v priebehu 1 hodiny v prítomnosti <sup>3</sup>H - uredinu (10 mCi/jamku) v objeme 2 ml na 24 - jamkovej planžete. Následne sa bunky zbierali, premývali jedenkrát v prostredí 199, usadeninu sme resuspendovali v 5 ml 199 prostredia a nechali v CO<sub>2</sub> - inkubátore ešte na 1 hodinu. Tieto procedúry sme uskutočnili s cieľom zbavenia sa nešpecificky naviazanej značky. Po skončení inkubácie bunky sa dvakrát premyli a zriedili do koncentracie 100 tisíc/ml. Pre cytotoxický test sa zmiešavali efekторы a terče v pomere 50:1 v objeme 200 ml v okrúhlo - dnovej 96 - jamkovej planžete. Kvalitatívna kontrola sa určovala spontánnym výstupom značky z terčikov, kde sa namiesto efektorov pridával k terčíkom zodpovedajúci objem PKP. Pre určenie maximálneho výstupu <sup>3</sup>H -uridinu, sa k terčíkom pridával 0,4 % roztok X - 100. Planžetu sme centrifugovali pri 500 ot./min. v priebehu 2 minút a uložili na 16 hodín do CO<sub>2</sub> - inkubátora. Po skončení kultivácie bunky sme preniesli na milliporové filtre „Titertek“ (Flow). Filtre sa sušili cez noc a následne sme ich preniesli do fľaštičiek s 5 ml. scintilačného roztoku. Rádiometriu sme vykonali v čítačke „B - Trac“ /USA/; hodnotili sme počet emitovaných impulzov za 1 min. Trojice hodnôt boli spriemerované.

Výpočet špecifickej lýzy terčových buniek (v %) sme urobili podľa vzorca:

$$\% \text{ lýzy} = [1 - (A - B) / (C - B)] \times 100$$

kde

A - rádioaktivita, emitovaná v prítomnosti efektorov

B - značka zostavajúca po opracovaní terčových buniek tritonom X - 100, alebo totálny východ

C - rádioaktivita , emitovaná terčikmi v neprítomnosti efektorov, alebo spontánný východ.

### **Výsledky a hodnotenie.**

Pri skúmaní cytotoxickej aktivity mononukleárov darcov je vidieť z (tab.I.) , že ju môžeme rozdeliť na tri podskupiny :

nízku -12%, strednú - 44,7 % a vysokú - 66%. Po aktivácii mononukleárov polyoxidoniom, cytotoxická aktivita v rôznych skupinách sa menila rôzne: v skupine s

nízkou aktivitou polyoxidonium prudko zvyšoval cytotoxicitu - skoro štyrikrát ; v podskupine so strednou aktivitou polyoxidonium neprejavil stimulačný vplyv -  $46,7 \pm 4,5$  ; a v podskupine s vysokou cytotoxickou aktivitou polyoxidonium preukázal inhibičný vplyv, t.j. znížil cytotoxicitu z 66% na 42%. Z vyššie uvedených hodnôt môžeme urobiť záver - že pri účinkovaní na cytotoxicitu nukleárov darcov polyoxidonium prejavil imunomodulačný účinok, t.j. normalizoval imunologické parametre.

**Tab.1** Vplyv polyoxidonia na cytotoxicitu mononukleárov zdravých darcov vo vzťahu k bunkám línie K-562.

Východzia cytotoxicita	Počet darcov	CT	CT + PO ( 50 µg/ml )
Nízka	2	12	45
Stredná	5	$44,7 \pm 6,9$	$46,7 \pm 4,5$
Vysoká	2	66	42

Pri skúmaní vplyvu polyoxidonia na cytotoxickú aktivitu neutrofilov a mononukleárov pacientov majúcih nádor z tab. 2 je vidieť, že východzia cytotoxická aktivita neaktivovaných neutrofilov a mononukleárov úplne chýba, ba dokonca sa pozorovala aj stimulácia rastu terčových buniek. Pri aktivácii polyoxidoniom v dávke 100 µg/ml sa pozorovalo prudké zvyšovanie cytotoxickej aktivity jednak u neutrofilov onkologických pacientov -  $54,0 \pm 2,1$ ; tak aj i u mononukleárov tých istých pacientov -  $62,1 \pm 1,7$ .

**Tab. 2** Vplyv polyoxidonia na cytotoxicitu neutrofilov a mononukleárov onkologických pacientov vo vzťahu k bunkám línie K-562.

Bunky	Počet chorých	Východzia CT	CT v prítomnosti polyoxidonia ( 100 µg/ml )
Neutrofily	6	Stimulácia rasu buniek línie K-562	$54,0 \pm 2,1$
Mononukleáry	7	Stimulácia rastu buniek línie K-562	$62,1 \pm 1,7$

Na základe uvedených hodnôt predpokladáme, že jednou z príčin rastu a neodtrhnutia nádoru môže byť náležité zníženie alebo vymiznutie u neutrofilov schopnosti inhibovať jeho rast. Nakoniec v rade závislosti je aj znížená schopnosť T - lymfocytov u onkologických pacientov produkovať IL - 2, ktorý aktivuje vlastnosti NF [10,13]. Syntéza IL - 2 nádorom - infiltrovanými lymfocytmi môže vyvolať prítok neutrofilov do nádoru, ich aktiváciu a následne zničenie nádoru. Masívna infiltrácia granulocytmi doprevádzaná odtrhnutím nádoru, bola pozorovaná pri injektovaní veľkých dávok IL - 2 do nádoru jednak u myší [8,9] tak aj u ľudí [12]. Analogická situácia sa pozorovala aj pri transplantácii nádoru myšiam u ktorých je vložený gén pre IL - 2, ktorý syntetizuje tento cytokín [6]. V tomto prípade efekt odtrhnutia nádoru úplne závisí od stupňa jeho infiltrácie NF.

Z hore uvedeného môžeme predpokladať, že pri opracovaní polyoxidoniom MNB tieto začali silne produkovať IL - 2, takže môžeme predpokladať, že polyoxidonium sám o sebe a taktiež MNB stimulované preparátom mali schopnosť zosilovať NK - aktivitu. Mechanizmus imunoregulačného účinku buniek, opracovaných polyoxidoniom, môže byť zabezpečený nielen sekréciou IL - 2, ale aj i expresiou v procese inkubácie s preparátom membrano - asociovanej formy IL - 2. Možno, že práve táto cesta prenosu signálu (prostredníctvom membrano - asociovaných foriem mediátorov), a nie sekréciou mediátorov do vonkajšieho prostredia, predstavuje najpozdnejšiu ale úplnú formu regulácie. Pri uskutočnení korelačnej analýzy medzi neutrofilmi a MNB aktivovaných 100 µg/ml polyoxidoniom bola objavená korelačná závislosť, t.j. môžeme predpokladať, že mechanizmus aktivácie v tom i druhom prípade je identický; t.j. pri účinkovaní polyoxidonia na neutrofilu vzniká expresia aktivovaných receptorov.

## **Záver:**

- 1., Pod vplyvom polyoxidonia cytotoxická aktivita darcovských mononukleárov podstupuje silnému imunostimulačnému účinku.
- 2., Polyoxidonium prejavuje silný imunostimulačný efekt na cytotoxickú aktivitu neutrofilov a mononukleárov u onkologických pacientov.

## **Literatúra:**

- 1., Kulakov V.V., Vorobjeva N.V., Pinegin B.V.// Immunologia. 1995. N.4. str.31-34
- 2., Chaitov R.M., Pinegin B.V.// Immunologia. 1995 N.3. str.6-9
- 3., Araki M.P., Inoue T., Gragoe E.J., Sendo F.// Cancer Res. 1991. Vol.51 p.3132-3135
- 4., Dallegri F., Ottonello L., Ballestrero A.// Inflammation. 1991. Vol.15 p.15-30
- 5., Boyum A.// J.Clin.Lab.Invest. 1968. 21(Suppl.97) p.77

- 6., Cavallo F., Giovarelli A.// J.Immunol. 1992. Vol.149. p.362-365
- 7., Kok P.M., van Kessel, van Verhoef.// Pathobiology. 1990. Vol.58 p.249-264
- 8., Forni G., Giovarelli M.// J.Immunol. 1985 Vol.137 p.3933-3938
- 9., Forni G., Giovarelli M.// J.Immunol. 1987. Vol.139 p.4033-4035
- 10., Kapp A., Zeck-Kapp G.// J.Invest.Dev. 1990. Vol.95. p.94-97
- 11., Lozzio C.B., Lozzio B.B.// Blood. 1975. Vol.321. p.249-264
- 12., Musiani P., Campora S.// J.Biol.Res.Mod. 1989. Vol.8 p.571-575
- 13., Stevens P., Piazza D.E.// Int. J. Immunopharmacol. 1990. Vol.12. p.605-608