

УДК 615.373.3: 615.38

## Влияние рекомбинантных препаратов интерлейкина-2 и интерферона-альфа 2b на продукцию антител у мышей при иммунизации эритроцитами барана

Ж.В. Пешняк, М.П. Потапнев, А.Г. Давыдовский, Е.М. Дворина

Государственное учреждение “Республиканский научно-практический центр гематологии и трансфузиологии” Министерства здравоохранения Республики Беларусь, г. Минск, Республика Беларусь

## Influence of the interleukin-2 and interferon-alpha 2b recombinant preparations on the production of antibody mice humoral immune response during immunization by sheep erythrocytes

J.V. Peshnyak, M. P. Potapnev, A.G. Davidovsky, E.M. Dvorina

State Institution “Republic Scientific and Manufactured Center of Hematology and Transfusiology” of Ministry of health care of Republic of Belarus, Minsk, Republic of Belarus

### Аннотация

Целью исследования была оценка эффективности влияния рекомбинантных препаратов ИЛ-2 “Ронколейкин” и ИФН- $\alpha$  “Эберон альфа Р” на первичный и вторичный гуморальный иммунный ответ у белых беспородных мышей-самцов, иммунизированных эритроцитами барана. Содержание IgM-антител определяли в сыворотке крови мышей в реакции гемагглютинации, неполные антитела IgG определяли в тесте с 10% желатином. Установлено повышение продукции антиэритроцитарных антител свидетельствующее о стимуляции первичного и вторичного гуморального иммунного ответа к окончанию индуктивного периода у белых беспородных мышей-самцов через 2 недели после первой иммунизации ЭБ совместно с однократным подкожным введением препаратов “Ронколейкин” в дозе 1000 МЕ/кг или “Эберон альфа Р” в дозах 2000 МЕ/кг и 5000 МЕ/кг по сравнению с титрами, полученными при иммунизации мышей ЭБ без иммуномодуляторов.

### Ключевые слова

Иммунизация, эритроциты барана, интерлейкин-2, интерферон-альфа, беспородные белые мыши-самцы.

### Summary

The investigation aim was the estimation of recombinant preparations of interleukin-2 “Roncoleukin” and interferon- $\alpha$  “Heberon Alpha R” influence on primary and second humoral immune response of non-breeding white male mice which were immunized by sheep erythrocytes. The IgM-antibody content was determined in mice blood serum by haemagglutination reaction. The content of incomplete antibodies IgG was determined by 10%-gelatine test. As a result of investigation has been proposed new stereotyped pattern of donor reimmunization was based on one-time intramuscular and intravenous injection of 3-4 ml alloerythrocytes Rh<sub>0</sub>(D) in common with recombinant preparations of “Roncoleukin” in dose 1000 ME/kg or “Heberon Alpha R” in dose 2000 ME/kg.

### Key words

Immunization, sheep erythrocytes, interleukin-2, interferon- $\alpha$ , non-breeding white male mice.

В последнее десятилетие значительно возросли потребности учреждений практического здравоохранения Министерства здравоохранения Республики Беларусь в лечебных и диагностических препаратах, таких, как препарат “Иммуноглобулин человека антирезус-D” и поликлональных диагностикумов (стандартных сывороток антирезус Rh<sub>0</sub> (D), стандартных универсальных антирезус-реагентов для определения резус-фактора - Rh<sub>0</sub> (D)), получаемых из донорской крови. В частности, за последние три года объемы выпуска препарата “Иммуноглобулин человеческий антирезус-D” (выпускается только ГУ “Республиканский научно-практический центр гематологии и трансфузиологии”) вырос в 1,5 раза [1]. Объемы выпуска диагностических сывороток находятся на одном уровне, в то время как потребность в них постоянно возрастает.

Вместе с тем, существенно повысились требования к качеству лечебных и диагностических препаратов. Согласно современным требованиям, титры анти-Rh<sub>0</sub> (D) антител для стандартных антирезус сывороток возросли до 1:256 (ранее 1:64), а для препарата “Иммуноглобулин человека антирезус-D” титр антител должен быть 1:512 в 1 мл [2].

Препараты цитокинов, в частности, рекомбинантный интерлейкин-2 (рИЛ-2) и интерферон-α (рИФН-α) значительно потенцируют антителопродукцию, обусловленную антигенами. На основании проведенных ранее экспериментальных исследований было установлено, что препараты рИЛ-2 при однократном введении в дозе 1000 МЕ/кг и выше вызывали дозозависимую стимуляцию антителообразующих колоний В-лимфоцитов у линейных мышей, иммунизированных субоптимальной дозой Т-зависимого антигена эритроцитами барана (ЭБ) [3]. При оценке влияния различных путей введения препарата рИЛ-2 в дозе 1000 МЕ/кг на фоне введения мышам субоптимальной дозы ЭБ был выявлен максимальный эффект на формирование антителообразующих колоний и образование гемагглютининов при подкожном введении препарата, наименьший – при внутривенном [4]. Усиление образования антител *in vivo* наблюдалось при введении рИЛ-2 в период индуктивной, но не продуктивной фазы иммунного ответа [5, 6, 7].

Известно, что препараты ИФН-α в низких концентрациях обладают стимулирующим действием на функции иммунокомпетентных клеток [8].

Ввиду того, что при иммунизации донорскими аллоэритроцитами Rh<sub>0</sub> (D) 60% изоиммунных доноров имеют низкие титры антител анти-Rh<sub>0</sub> (D) или вообще не отвечают выработкой антител на антигенный стимул, было предложено использовать иммуномодуляторы, вводимые одновременно с иммуногеном, для повышения титров антител в сыворотке крови иммунизируемых доноров. В связи с этим значительный интерес представляет возможность использования рекомбинантных препаратов цитокинов рИЛ-2 и рИФН-α для стимуляции гуморального иммунного ответа при иммунизации антигенами.

Целью работы была оценка гуморального иммунного ответа у мышей при их иммунизации ЭБ одновременно с рекомбинантными препаратами цитокинов ИЛ-2 и ИФН-α.

### Материалы и методы

Объектом исследования являлась сыворотка крови 134 белых беспородных мышей-самцов 2-3 месячного возраста, весом 22±2 г. До начала иммунизации экспериментальные животные находились на адаптационном карантине и стандартном рационе вивария.

Первичную иммунизацию осуществляли путем внутримышечного введения в бедренную мышцу экспериментальным животным оптимальной дозы ЭБ (2x10<sup>8</sup>/мышь) и одновременно подкожно – препаратов рИЛ-2 “Ронколейкин” (ООО “Биотех”, г. Санкт-Петербург, Российская Федерация) в дозах 1000 и 2500 МЕ/кг или рИФН-α 2b “Эберон альфа Р” (АО “Невер Biotec”, г. Гавана, Куба) в дозах 2000 и 5000 МЕ/кг. Две последующие реиммунизации проводили через 3-4 дня с введением субоптимальной дозы ЭБ (10<sup>7</sup>/мышь). Экспериментальным животным, составляющим группу сравнения, вводили ЭБ и физиологический раствор (физ. р-р). Эксперименты включали по 8 групп мышей: 1-я – контрольная группа (мышь, которым вводили только физиологический раствор; 2-я – физиологический раствор и “Ронколейкин” в дозе 2500 МЕ/кг; 3-я – физиологический раствор и “Эберон альфа Р” в дозе 5000 МЕ/кг, 4-я – ЭБ и физиологический раствор; 5-я – ЭБ и “Ронколейкин” в дозе 1000 МЕ/кг; 6-я – ЭБ и “Ронколейкин” в дозе 2500 МЕ/кг; 7-я – ЭБ и “Эберон альфа Р” в дозе 2000 МЕ/кг; 8-я – ЭБ и “Эберон альфа Р” в дозе 5000 МЕ/кг.

Для оценки эффективности влияния иммуномодуляторов на продукцию антиэритроцитарных антител кровь брали у мышей из ретро-

орбитального синуса через 2 и 4 недели после начала иммунизации. Для получения сыворотки кровь инкубировали 45 мин при 37 °С, затем центрифугировали при 1000 об/мин в течение 15 мин. Сыворотку переносили в эппендорфы и термоинактивировали при 56° С в течение 30 мин. Содержание IgM определяли в сыворотке крови мышей в реакции гемагглютинации (РА) [9]. Для выявления полных антител класса IgM к ЭБ методически РА проводили в 96-луночных круглодонных микропланшетах ("Sarsted", США), смешивая 0,05 мл двукратно разведенных образцов исследуемых сывороток и 0,025 мл 2%-ой взвеси ЭБ. Микропланшеты инкубировали в течение 1 ч при 37°С. Результаты оценивали по шкале "++++". Положительной считали реакцию гемагглютинации не менее "++". Учет реакции оценивали также микроскопически. Положительной считали реакцию, если под микроскопом наблюдали не менее 3 конгломератов (скоплений) ЭБ. Неполные антитела IgG определяли в тесте с 10 % желатином [10]. Результат учитывали следующим образом: 1) "лаковая" кровь указывала на полный гемолиз ЭБ (отрицательный результат), 2) при наличии взвеси сгустков ЭБ под микроскопом устанавливали последний титр, для которого еще были характерны агглютинаты.

Статистический анализ полученных результатов проводили с использованием пакета программ "Microsoft Excel 97". Достоверность различий между сравниваемыми величинами определяли непараметрическим методом по Фишеру в F-тесте. Различия считали достоверными при значении  $P < 0,05$ .

### Результаты и обсуждение

В экспериментальных исследованиях, результаты которых представлены в таблице 1, было установлено что уровень IgM, характеризующий первичный иммунный ответ на антигенный стимул, через 2 недели (конец индуктивного периода иммунного ответа) после иммунизации ЭБ и препаратом "Эберон альфа Р" был достоверно выше в дозе 2000 МЕ/кг в 5,7 раза (титр  $201,1 \pm 65,8$ ,  $n=7$ ,  $P=0,0004$ ) и в дозе 5000 МЕ/кг в 4,0 раза (титр  $144,0 \pm 68,3$ ,  $n=7$ ,  $P=0,0003$ ) по сравнению с иммунизацией только ЭБ (титр  $35,6 \pm 12,9$ ,  $n=9$ ). Наоборот, достоверно низкий уровень IgM был отмечен при иммунизации ЭБ при одновременном введении препарата рИЛ-2 в дозе 2500 МЕ/кг (титр  $20,7 \pm 6,0$ ,  $n=9$ ,  $P=0,045$ ).

Через 4 недели после начала иммунизации ЭБ (конец продуктивного периода иммунного ответа) отмечался достоверно высокий уровень IgM под действием препарата рИФН- $\alpha$  в дозе 5000 МЕ/кг (титр  $142,2 \pm 70,9$ ,  $n=9$ ,  $P=0,008$ ) по сравнению с иммунизацией только ЭБ (титр  $64,0 \pm 21,9$ ,  $n=6$ ).

Через 2 недели после начала иммунизации ЭБ с одновременным введением препарата рИЛ-2 "Ронколейкин" в дозе 1000 МЕ/кг отмечена стимуляция продукции неполных антиэритроцитарных антител класса IgG в 4,4 раза (титр  $42,0 \pm 13,1$ ,  $n=12$ ,  $P=0,0001$ ), а введение препарата рИФН- $\alpha$  2b "Эберон альфа Р" в дозах 2000 и 5000 МЕ/кг вызывало повышение титра антител класса IgG, соответственно, в 4,2 (титр  $40,3 \pm 16,5$ ,  $n=7$ ,  $P=0,0003$ ) и 4,1 раза (титр  $39,4 \pm 16,5$ ,  $n=7$ ,  $P=0,00031$ ) по сравнению с животными, иммунизированными только ЭБ (титр  $9,6 \pm 3,1$ ,  $n=9$ ).

Установлено, что через 4 недели после начала иммунизации ЭБ с применением препарата рИФН- $\alpha$  2b "Эберон альфа Р" в дозе 2000 МЕ/кг отмечено повышение содержания антиэритроцитарных антител класса IgG в 1,4 раза по сравнению с его уровнем у мышей, иммунизированных только ЭБ. Кроме того, через 4 недели после начала иммунизации ЭБ у 16,6% белых беспородных мышей-самцов было отмечено отсутствие гуморального иммунного ответа по сравнению с группами экспериментальных животных, которым вводили ЭБ одновременно с иммуномодуляторами. Установлено значимое повышение первичного и вторичного гуморального иммунного ответа на выработку антиэритроцитарных антител у белых беспородных мышей-самцов через 2 недели (конец индуктивного периода иммунного ответа) после первой иммунизации ЭБ одновременно с однократным подкожным введением препаратов "Ронколейкин" в дозе 1000 МЕ/кг (IgM в 1,8 раза, IgG в 4,4 раза) и "Эберон альфа Р" в дозах 2000 МЕ/кг (IgM в 5,7 раза, IgG в 4,2 раза) и 5000 МЕ/кг (IgM в 4,0 раза, IgG в 4,1 раза), по сравнению к титрам, полученным при иммунизации мышей ЭБ без иммуномодуляторов. Предлагаемые дозы рИЛ-2 и рИФН- $\alpha$  для однократного введения были ниже суточных терапевтических – в 7,1 раза для препарата "Ронколейкин" при дозе 1000 МЕ/кг (суточная терапевтическая доза 500 000 МЕ) и в 21,4 раза для препарата "Эберон альфа Р" при дозе 2000 МЕ/кг (суточная терапевтическая доза 3000 000 МЕ).

Полученные результаты свидетельствуют об эффективности применения препаратов "Рон"

Таблица 1

Титры антиэритроцитарных антител у белых беспородных мышей-самцов, иммунизированных эритроцитами барана без/с иммуномодуляторами

Группы мышей	Варианты	Доза цитокина МЕ/кг	Титр Ig M, M±m	ИС	Титр Ig G, M±m	ИС
Через 2 недели после начала иммунизации						
1	Контроль (физ. р-р)		0 n=9		0 n=9	
2	Физ. р-р+		0 n=8		0 n=8	
3	Физ. р-р+ Эберон альфа Р	2500 5000	0 n=7		0 n=7	
4	ЭБ+физ. р-р		35,6±12,9 n=9	1	9,6±3,1 n=9	1
5	ЭБ+ Ронколейкин	1000	62,7±14,8 n=12	1,8 P=0.439	42,0±13,1* n=12	4,4 P=0.0001
6	ЭБ+ Ронколейкин	2500	20,7±6,0* n=9	0,6 P=0.045	9,8±3,1 n=9	1,02 P=0.992
7	ЭБ+ Эберон альфа Р	2000	201,1±65,8* n=7	5,7 P=0.0004	40,3±16,5* n=7	4,2 P=0.0003
8	ЭБ+ Эберон альфа Р	5000	144±68,3* n=7	4,0 P=0.0003	39,4±16,5* n=7	4,1 P=0.00031
Через 4 недели после начала иммунизации						
1	Контроль (физ. р-р)		0 n=9		0 n=9	
2	Физ. р-р+	2500	0 n=7		0 n=7	
3	Физ. р-р + Эберон альфа Р	5000	0 n=9		0 n=9	
4	ЭБ+физ. р-р		64,0±21,9 n=6	1	80,0±23,0 n=6	1
5	ЭБ+ Ронколейкин	1000	76,9±34,7 n=9	1,2 P=0.159	71,8±28,3 n=9	0,9 P=0.382
6	ЭБ+ Ронколейкин	2500	49,8±11,8 n=9	0,8 P=0.282	72,0±15,3 n=9	0,9 P=0.579
7	ЭБ+ Эберон альфа Р	2000	106,0±34,9 n=8	1,7 P=0.198	110,5±35,7 n=8	1,4 P=0.216
8	ЭБ+ Эберон альфа Р	5000	142,2±70,9* n=9	2,2 P=0.008	89,8±33,8 n=9	1,1 P=0.212

Примечание

\* - достоверность отличий P&lt;0,05 по отношению к титрам антиэритроцитарных антител у белых беспородных мышей-самцов, иммунизированных эритроцитами барана (4 группа); ИС – индекс стимуляции

колейкин” и “Эберон альфа Р” в исследованных дозах для повышения стимуляции продукции антиэритроцитарных антител *in vivo*.

### Заключение

Установлено повышение продукции антиэритроцитарных антител свидетельствующее о стимуляции первичного и вторичного гуморального иммунного ответа к окончанию индуктивного периода у белых беспородных мышей-самцов через 2 недели после первой иммунизации ЭБ совместно с однократным подкожным введением препаратов “Ронколейкин” в дозе 1000 МЕ/кг или “Эберон альфа Р” в дозах 2000 МЕ/кг и 5000 МЕ/кг по сравнению с титра-

ми, полученными при иммунизации мышей ЭБ без иммуномодуляторов.

Для повышения уровня титров антиэритроцитарных антител у изоиммунных доноров на основании результатов исследования предложена принципиально новая схема их реиммунизации путем однократного внутримышечного или внутривенного введения антигена (3-4 мл аллоэритроцитов Rh<sub>0</sub> (D)) с одноразовым введением иммуномодулятора (препаратов рИЛ-2 Ронколейкин” в дозе 1000 МЕ/кг или рИФН-альфа “Эберон альфа Р” в дозе 2000 МЕ/кг). Традиционно используемая схема реиммунизации доноров требует трехкратного введения 3-4 мл аллоэритроцитов Rh<sub>0</sub> (D), с интервалом через 3-4 дня [11].

### Литература

1. Сидельникова В.М. Профилактика резус-сенсibilизации. Российский мед. журнал: научн.-практ. журнал. М.: Медицина, 2005; 3: 29-31.
2. Временная фармакопейная статья 0943-06 “Иммуноглобулин человека антирезус-Д”, утвержденная МЗ РБ 31 января 2006 г.: 12.
3. Потапнев М.П., Зобнин В.Д., Рукша Е.В. Иммуномодулирующее действие рекомбинантного интерлейкина-2 человека на реакции гуморального и клеточного иммунитета у мышей. Иммунология. 1991; 3: С. 23-6.
4. Potapnev M., Zobnin V., Ruksha E. The influence of recombinant human interleukin 2 on humoral and cell-mediated immune response in mice *in vivo*. Abstr. of Int. conf. on Med. Biotechn. Immunization and AIDS. Leningrad. 1991: 3-5.
5. Потапнев М.П., Зобнин В.Д., Мартинович Е.Е. и соавт. Иммуномодулирующее действие рекомбинантного интерлейкина 2 человека. Тез. докл. I Всесоюзного иммунол. съезда. М. 1989; Т. I: 356.
6. Потапнев М.П., Зобнин В.Д., Мартинович А.Е. и соавт. Стимуляция реакций гуморального и клеточного иммунитета *in vivo* и *in vitro* рекомбинантным интерлейкином-2 человека. Тез. докл. I иммунол. съезда Белоруссии. Минск. 1990: 19-20.
7. Potapnev M.P., Zobnin V.D. *In vivo* different effects of recombinant human interleukin 2 upon humoral and T cell-mediated immunity formation in mice. Abstracts of symposium “Molecular factors of hematopoiesis and stem cell”. М. 1990: 32.
8. Мальцева Н.М. Иммуномодулирующее действие интерферона. Иммуномодуляторы. Сб. трудов.: под ред. Р.В. Петрова, Б.Ф. Семенова. М. 1987: 125-32.
9. Потапнев М.П., Борткевич Л.Г., Печковский Д.В. и соавт. Методические рекомендации по экспериментальному (доклиническому) испытанию иммуномодулирующего действия фармакологических средств. Минск. 1999: 5-6.
10. Инструкция по исследованию сыворотки на наличие резус-антител, утвержденной МЗ СССР 7 сентября 1990 г., № 05-14/30, Москва, 1991: 8-10.
11. Инструкция по иммунизации доноров для получения сыворотки и иммуноглобулина антирезус, утверждена Минздравом СССР, приказ № 06-14/10 от 3 ноября 1977 г.: 254-261.