

УДК: 577.175.325:612.018:612-092.9

## Влияние IL-2 на цитокиновый профиль и уровень гормонов в сыворотке крови морских свинок

А.В.Полікарпова<sup>1</sup>, Т.В.Горбач<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Харьковский национальный университет имени В.Н.Каразина (Харьков, Украина)<sup>2</sup>Харьковский национальный медицинский университет (Харьков, Украина)

Исследовано влияние IL-2 на концентрацию некоторых других цитокинов: интерлейкинов 1 $\beta$ , 4 (IL-1 $\beta$ , IL-4), фактора некроза опухоли- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) и гормонов гипофиза и коры надпочечников (СТГ, АКТГ, кортикостерона) в сыворотке крови морских свинок в динамике через 1, 3 и 8 часов после инъекции. Для введения использовался Ронколейкин – полный структурный и функциональный аналог IL-2 (Roncoleukin, «Биотех», г. Санкт-Петербург). Результаты исследования показали, что введение IL-2 увеличивало содержание провоспалительных интерлейкинов IL-1 $\beta$  и TNF- $\alpha$ , снижало уровень IL-4. Наблюдалась сходная динамика между изменением уровней IL-2 в сыворотке крови и содержанием АКТГ и кортикостерона. Через 3 часа после инъекции возрастал уровень СТГ с дальнейшим постепенным повышением, наблюдалась положительная корреляция между концентрацией IL-1 $\beta$  и СТГ.

**Ключевые слова:** цитокины, IL, TNF- $\alpha$ , АКТГ, СТГ, кортикостерон.

## Вплив IL-2 на цитокиновий профіль і рівень гормонів у сироватці крові морських свинок

Г.В.Полікарпова, Т.В.Горбач

Досліджено вплив IL-2 на концентрацію деяких інших цитокинів: інтерлейкінів 1 $\beta$ , 4 (IL-1 $\beta$ , IL-4), фактору некрозу пухлини- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) та гормонів гіпофізу і кори надниркових залоз (СТГ, АКТГ, кортикостерону) у сироватці крові морських свинок у динаміці через 1, 3 і 8 годин після ін'єкції. Для введення використовувався Ронколейкін – повний структурний і функціональний аналог IL-2 (Roncoleukin, «Биотех», м. Санкт-Петербург). Результати дослідження показали, що введення IL-2 збільшувало вміст прозапальних інтерлейкінів IL-1 $\beta$  і TNF- $\alpha$ , зменшувало рівень IL-4. Спостерігалася схожа динаміка між змінами рівнів IL-2 в сироватці крові і вмістом АКТГ і кортикостерону. Через 3 години після ін'єкції зростає рівень СТГ з подальшим поступовим підвищенням, спостерігалася позитивна кореляція між концентраціями IL-1 $\beta$  та СТГ.

**Ключові слова:** цитокини, IL, TNF- $\alpha$ , АКТГ, СТГ, кортикостерон.

## IL-2 influence on the cytokine profile and hormones level in guinea pigs blood serum

A.V.Polikarpova, T.V.Gorbach

Influence of IL-2 on the concentration of some other cytokines: interleukins 1 $\beta$ , 4 (IL-1 $\beta$ , IL-4), tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) and hormones of hypophysis and cortex of adrenal glands (STH, ACTH, corticosteron) in the blood serum of guinea pigs has been investigated at 1, 3 and 8 hours after injection. Intact animals were injected subcutaneously by Roncoleukin – the full structural and functional analogist of IL-2 (Roncoleukin, "Biotech", Saint Petersburg). Results of study showed that injection of IL-2 has increased the concentration of pro-inflammatory interleukins IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$ , has decreased the level of IL-4. The similar dynamics between IL-2 levels changes in blood serum and contents of ACTH and corticosteron were showed. In 3 hour after injection STH level increased with following gradual increase, positive correlation between concentrations of IL-1 $\beta$  and STH was observed.

**Key words:** cytokines, IL, TNF- $\alpha$ , ACTH, STH, corticosteron.

### Введение

Одной из важнейших самостоятельных систем регуляции защитных реакций организма является система цитокинов. Цитокины и факторы роста являются полипептидными переносчиками сигналов, которые, связываясь с клетками-мишенями с помощью специфических мембранных рецепторов, вызывают затем ряд важных клеточных реакций (Ворсанов и др., 1998).

В последнее время стало ясно, что система цитокинов находится в тесной связи с эндокринной, оказывает влияние на систему гормонов гипоталамуса (Nowico et al., 2005), однако механизмы регуляторных влияний цитокинов на эндокринные функции гипоталамуса не выяснены. Установлено, что интерлейкин-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), фактор некроза опухоли- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) и интерлейкин-2 (IL-2)

способны непосредственно воздействовать на центральную нервную систему, существенным образом изменяя синтез ряда гормонов (Thomson, 1992).

IL-2 – наиболее изученный аутокринный и паракринный модулятор разных биологических реакций. IL-2 в организме человека и животных продуцируется, в основном, Т-хелперами, стимулированными антигенами или лектинами при наличии IL-1 и интерлейкина-6 (IL-6) (Змушко и др., 2001). Спектр действия IL-2 очень разнообразный и включает прямой и опосредованный эффект. Прямые эффекты IL-2 обусловлены взаимодействием цитокина со специализированными рецепторами. Рецепторы к IL-2 имеются во всех клетках, кроме эритроцитов, в особенно больших количествах экспрессируются на активированных Т-клетках и киллерных лимфоцитах, поэтому возможно его влияние на синтез других интерлейкинов. В частности, увеличение синтеза IL-1 $\beta$  связано с активацией макрофагов, а TNF- $\alpha$  – с активацией Т-лимфоцитов.

TNF- $\alpha$  обладает пирогенностью, активирует воспалительные клетки, стимулирует экспрессию молекул адгезии, активирует синтез белков острой фазы.

IL-1 $\beta$  продуцируется, в основном, активированными макрофагами. Под его действием создаются условия для пролиферации лимфоцитов и созревания клона активированных клеток. IL-1 $\beta$  оказывает стимулирующее действие на В-лимфоциты и продукцию антител. Он усиливает продукцию адгезивных молекул, что приводит к повышению адгезии лейкоцитов к эндотелиальным клеткам.

К прямым эффектам IL-2 относятся (Змушко и др., 2001):

- активация клональной пролиферации Т-лимфоцитов;
- стимуляция клеточной дифференцировки цитотоксических Т-лимфоцитов;
- стимуляция клональной пролиферации В-лимфоцитов;
- увеличение синтеза плазматическими клетками Ig M, Ig G, IgA;
- увеличение функциональной активности мононуклеарных фагоцитов;
- уменьшение уровня спонтанного и активированного апоптоза Т-хелперов, В-лимфоцитов.

К опосредованным эффектам IL-2 относят (Hammerling et al., 1992):

- коррекцию субпопуляционного баланса Th1 и Th2 хелперных клеток;
- увеличение продукции эндогенных интерферонов;
- повышение экспрессии молекул адгезии и рецепторов для цитокинов на цитоплазматических мембранах различных клеток;
- интенсификацию процессов пролиферации и дифференцировки эозинофилов и тромбоцитов;
- угнетение гемопозза в эритроидном и миелоидном ростках кроветворения;
- активное влияние на функцию желез внутренней секреции;
- увеличение уровня неоптерина и инсулиноподобного фактора роста-1.

Наименее изученными являются вопросы влияния IL-2 на коррекцию цитокинового профиля и функцию желез внутренней секреции. Эти аспекты действия являются чрезвычайно важными в связи с реальной возможностью использования его рекомбинантного аналога как средства иммуномодулирующей терапии.

Целью нашего исследования являлось изучение в эксперименте влияния экзогенно введенного IL-2 на содержание провоспалительных и противовоспалительных интерлейкинов и концентрацию некоторых гормонов.

#### **Объекты и методы исследования**

Исследование проведено на четырехмесячных самках морских свинок, содержащихся в стандартных условиях вивария. Животным подкожно вводили разведенный в 50 раз Ронколейкин по 0,1 мл (полный структурный и функциональный аналог IL-2). Ронколейкин – лекарственная форма рекомбинантного интерлейкина 2, выделенного из клеток дрожжей *Sacharomyces cerevisiae* и очищенного. Ронколейкин содержит в качестве активного начала рекомбинантный IL-2, а также солюбилизатор – додецилсульфат натрия, стабилизатор – D-маннит, восстановитель – дитиотритиол и компоненты аммоний-гидрокарбонатного буфера. Препарат произведен в России (Roncoleukin, «Биотех», г. Санкт-Петербург). Использовали ампулированную форму препарата: ампулы по 0,25 мг (250000 ME) IL-2.

Доза препарата для животных рассчитывалась по формуле Рыболовлева (Рыболовлев, 1979). Контрольной группе животных вместо Ронколейкина подкожно в дозе 0,1 мл вводили физиологический раствор. Определение содержания IL-1, IL-2, TNF- $\alpha$ , IL-4 и гормонов проводилось иммуноферментным методом с помощью наборов реактивов формы DKG (Германия). Исследования проводились в динамике: через 1 час, 3 и 8 часов после инъекции.

Статистическая обработка данных проводилась с помощью компьютерной программы MS Office Excel – 2003.

### Результаты и обсуждение

Проведенные эксперименты показали, что через 1 час после инъекции содержание IL-2 в сыворотке крови экспериментальных животных увеличивается почти в 20 раз. Одновременно концентрация TNF- $\alpha$  увеличивалась в 2,0 раза, IL-1 $\beta$  – в 1,5 раза, а уровень IL-4 не отличался от такового у животных контрольной группы (табл. 1).

Таблица 1.

**Содержание интерлейкинов в сыворотке крови морских свинок до введения и после введения Ронколейкина**

Группы животных	Показатели			
	IL-1 $\beta$ , пкг/мл	IL-2, пкг/мл	TNF- $\alpha$ , пкг/мл	IL-4, пкг/мл
Контроль: n=15	7,83 $\pm$ 0,34	16,43 $\pm$ 1,08	1,35 $\pm$ 0,07	20,71 $\pm$ 1,25
Эксперимент: n=12:				
До введения препарата	7,63 $\pm$ 0,47	15,96 $\pm$ 1,22	1,24 $\pm$ 0,12	19,55 $\pm$ 1,37
Через 1 час после введения препарата	11,75 $\pm$ 1,08*	317,22 $\pm$ 11,34*	2,74 $\pm$ 0,11*	19,83 $\pm$ 1,45
Через 3 часа после введения препарата	15,79 $\pm$ 1,34*	176,14 $\pm$ 10,43*	7,34 $\pm$ 0,28*	13,42 $\pm$ 1,07*
Через 8 часов после введения препарата	25,41 $\pm$ 0,49*	16,93 $\pm$ 1,22	6,11 $\pm$ 0,42*	12,68 $\pm$ 1,07*

Примечание: \* –  $p \geq 0,05$ .

Через 3 часа содержание IL-2 снизилось, но осталось выше, чем в контрольной группе, в 10,5 раз. Уровень TNF- $\alpha$  в этот период увеличился и стал выше, чем в контрольной группе, более чем в 5 раз (табл. 1). Уровень IL-1 $\beta$  возрос примерно в 2 раза по сравнению с животными контрольной группы. Содержание IL-4 у всех животных значительно снизилось.

Через 8 часов после инъекции препарата содержание IL-2 снизилось и стало лишь в 2 раза выше, чем в контрольной группе, уровень TNF- $\alpha$  у животных опытной группы более чем в 4 раза превышал его содержание в контроле. Уровень IL-1 $\beta$  в 3 раза превышал его уровень у контрольных животных. Содержание IL-4 в этот период времени не отличалось от такового через 3 часа после инъекции Ронколейкина (табл. 1).

Изучение содержания гормонов показало, что через 1 час после введения препарата происходит значительное повышение уровня адренокортикотропного гормона (АКТГ), кортикостерона, уровень соматотропного гормона (СТГ) несколько увеличен, однако изменения недостоверны (табл. 2).

Таблица 2.

**Содержание некоторых гормонов в сыворотке крови морских свинок до введения и после введения Ронколейкина**

Группы животных	Показатели		
	Кортикостерон, нМ/л	СТГ, мкг/л	АКТГ, нг/л
Контроль, n=15	4,09 $\pm$ 0,37	5,37 $\pm$ 0,51	10,23 $\pm$ 0,79
Эксперимент, n=12:			
До введения препарата	4,11 $\pm$ 0,24	5,49 $\pm$ 0,44	9,87 $\pm$ 0,67
Через 1 час после введения препарата	6,79 $\pm$ 0,41*	6,00 $\pm$ 0,55	17,16 $\pm$ 1,79*
Через 3 часа после введения препарата	5,82 $\pm$ 0,37*	7,63 $\pm$ 0,44*	21,89 $\pm$ 1,62*
Через 8 часов после введения препарата	5,08 $\pm$ 0,39*	9,21 $\pm$ 0,59*	15,27 $\pm$ 1,17*

Примечание: \* –  $p \geq 0,05$ .

Через 3 часа содержание АКТГ еще больше увеличивается, а кортикостерона – несколько снижается, увеличивается содержание СТГ (табл. 2). Через 8 часов после инъекции уровень АКТГ и кортикостерона выше, чем в контрольной группе, но ниже, чем через 3 часа. Концентрация СТГ достигла максимального уровня через 8 часов после введения IL-2, то есть в момент максимальной концентрации IL-1 $\beta$  (табл. 2).

Результаты исследования показали, что введение Ронколейкина вызывает достоверное повышение концентрации TNF- $\alpha$  и IL-1 $\beta$  уже через 1 час после инъекции. Однако, если дальнейшая

динамика изменений уровня TNF- $\alpha$  схожа с динамикой содержания IL-2, в случае IL-1 $\beta$  наблюдается постепенное возрастание его концентрации, достигающее максимума в момент снижения IL-2 до контрольного значения. Введение Ронколейкина не приводит к изменению концентрации IL-4 через 1 час, однако затем наблюдается постепенное снижение уровня данного интерлейкина.

Как видно из полученных данных, IL-2 оказывает выраженное действие на содержание TNF- $\alpha$ , в меньшей степени влияет на уровень IL-1 $\beta$  и IL-4. На протяжении всего исследуемого периода содержание IL-2 остается высоким и индуцирует преобладающее действие провоспалительных цитокинов, запуская интерлейкиновый каскад. Провоспалительные цитокины (IL-1 $\beta$  и TNF- $\alpha$ ) стимулируют синтез белков острой фазы воспаления, активируют другие типы клеток, вовлеченных в воспалительный ответ (Т и В-лимфоциты, эндотелий), стимулируют экспрессию молекул адгезии (ICAM-1, VCAM-1) и антигенов МНС, стимулируют хемоаттрактивную активность, продукцию простагландинов и оксида азота (Ветро и др., 2000), а также могут оказывать влияние на продукцию гормонов (Иммунодефицитные состояния, 2000). Поэтому можно ожидать, что введение IL-2 оказывает иммуностимулирующий эффект.

Исследование уровней гормонов показало, что введение препарата вызывает достоверное повышение содержания АКТГ и кортикостерона через 1 час. Дальнейшая динамика изменений концентраций данных гормонов похожа на динамику содержания IL-2 (коэффициент корреляции 0,59 для АКТГ и 0,94 для кортикостерона). Через 1 час после введения препарата уровень соматотропина достоверно не отличался от контрольного, затем наблюдалось постепенное повышение уровня соматотропина, достигающее максимума через 8 часов во время снижения содержания IL-2 до контрольного значения.

Исходя из результатов эксперимента, можно предположить, что IL-2 оказывает активирующее влияние на синтез АКТГ и кортикостерона и практически не влияет на уровень СТГ (содержание АКТГ и кортикостерона увеличивается при максимальном содержании IL-2 и снижается при уменьшении IL-2 (рис. 1, 2); уровень СТГ при максимальном содержании IL-2 практически не отличается от контрольного).

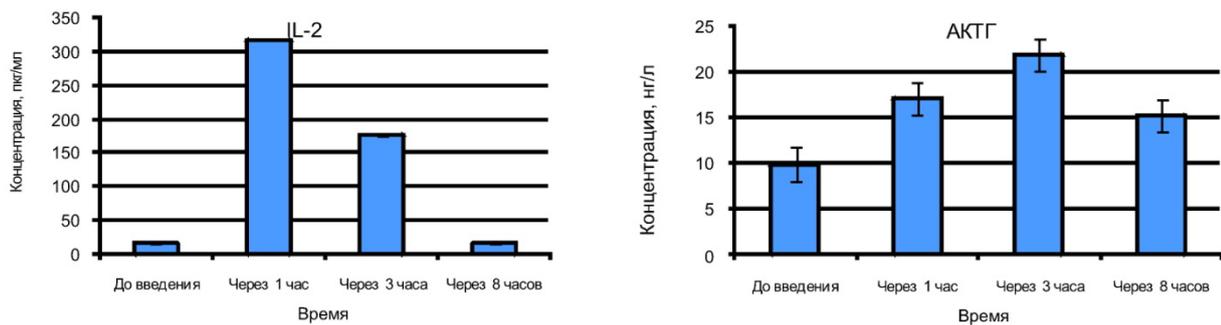


Рис. 1. Изменение уровней IL-2 и АКТГ после введения Ронколейкина

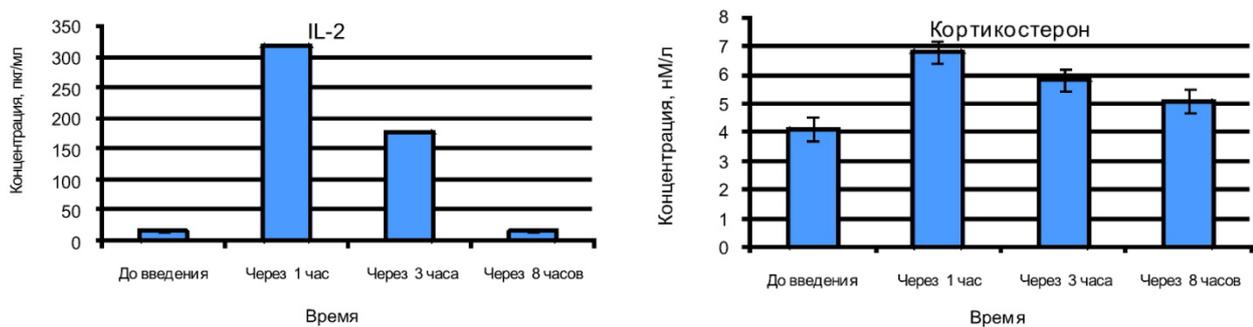
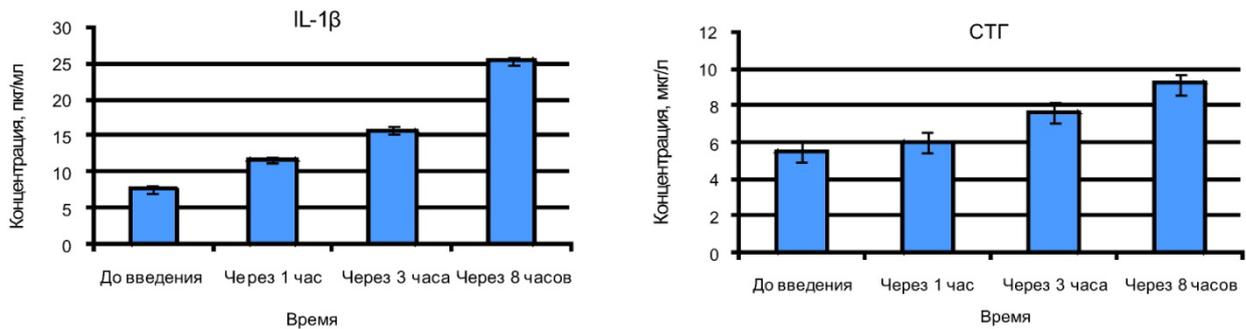


Рис. 2. Изменение уровней IL-2 и кортикостерона после введения Ронколейкина

По-видимому, на уровень СТГ в значительной степени влияет IL-1 $\beta$ , так как максимальное содержание СТГ у животных опытной группы отмечалось именно в период максимальной концентрации IL-1 $\beta$ , динамика изменений уровней данных показателей была похожей (коэффициент корреляции =0,98) (рис. 3).



**Рис. 3. Изменение уровней IL-1 $\beta$  и СТГ после введения Ронколейкина**

Литературные данные свидетельствуют, что продукты деятельности макрофагов в ЦНС обеспечивают центральную регуляцию иммунного ответа в острую фазу, а также объединяют все системы организма в «борьбе» за обеспечение гомеостаза. Моноциты и макрофаги способны синтезировать нейропептиды – АКТГ и  $\beta$ -эндорфин, таким образом, проявляя эффекты ауторегуляции иммунного ответа (аутокринное воздействие). IL-1 увеличивает функциональную активность гипоталамуса, а также продукцию катехоламинов не только на периферии, но и в ЦНС. Провоспалительные интерлейкины являются также мощными стимуляторами гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой системы, в первую очередь, через стимуляцию синтеза и секреции проопиомеланокортина, который является молекулой-предшественником опиатов, меланоцитстимулирующего гормона и кортикотропина (Казаков и др., 2004).

Таким образом, было показано, что введение IL-2 стимулирует активацию каскада провоспалительных цитокинов, а также выраженную реакцию со стороны гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой системы.

#### **Выводы**

1. IL-2 оказывает влияние на цитокиновый профиль сыворотки крови морских свинок: увеличивает содержание IL-1 $\beta$  и TNF- $\alpha$ , снижает содержание IL-4.
2. IL-2 активирует синтез АКТГ и кортикостерона, увеличивает концентрацию СТГ.
3. Уровень СТГ в значительной мере определяется содержанием IL-1 $\beta$ .
4. IL-2 является важным фактором развития адаптивного иммунитета.

#### **Список литературы**

- Ветро Я.Я., Иванова Л.В., Крейле Л.Э. Цитокины // Гематология и трансфузиология. – 2000. – №4. – С. 45–48.
- Ворсанов А.Ф., Бутенко А.К., Зак К.П. Цитокины. Биологические и противоопухолевые свойства. – Киев: Наукова думка, 1998. – 320с.
- Змушко Е.И., Белозеров Е.С., Митин Ю.А. Клиническая иммунология. Руководство для врачей. – СПб, 2001. – 574с.
- Иммунодефицитные состояния / Под ред. В.С.Смирнова и И.С.Фрейдмен. – СПб, 2000. – 561с.
- Казаков В.Н., Снегирь М.А., Снегирь А.Г. и др. Пути взаимодействия нервной, эндокринной и иммунной систем в регуляции функций организма // Архив клинической и экспериментальной медицины. – 2004. – Т.13, №1–2. – С. 3–10.
- Рыболовлев Ю.Р. Дозирование веществ для млекопитающих по константам биологической активности // Доклады АН СССР. – 1979. – Т.247, №6. – С. 1513–1516.
- Hammerling U., Henningsson A.-C., Sjödin L. Development and validation bioassay for interleukin-2 // Pharmaceut. Biochem. Analysis. – 1992. – Vol.10. – P. 547–560.
- Nowico L.T., Niemir Z., Stein H., Waldherr R. Cytokines and growth factors in renal disease // Nephrol. Dial. Transplant. – 2005. – Vol.10. – P. 775–786.
- Thomson A.W. (Ed.) The cytokine handbook. – London: Acad. Press, 1992. – 418p.

**Представлено: В.І.Жуковим**  
**Рекомендовано до друку: В.В.Мартиненко**

© Г.В.Полікарпова, Т.В.Горбач, 2009