

ВИВЧЕННЯ ДІЇ ІЛ-4 ТА ІЛ-4Δ2 НА ПРОДУКЦІЮ ЦИТОКІНІВ Т-ЛІМФОЦИТАМИ

О.А.Бочаров, Н.І.Філімонова

Національний фармацевтичний університет

Ключові слова: цитокіни; інтерлейкін-4Δ2; макрофагальний хемоатрактантний протеїн (МХП-1); бронхіальна астма

Інтерлейкін-4 бере участь у регуляції різних функцій В-лімфоцитів, Т-лімфоцитів, макрофагів та інших клітин. Експресія ІЛ-4 гена здійснюється в двох мРНК формах: ІЛ-4 і ІЛ-4Δ2. Особливий інтерес до ІЛ-4 і ІЛ-4Δ2 пов'язаний з їх роллю в патогенезі захворювань алергічної, запальної, автоімунної та інфекційної природи. Вивчали функціональні ефекти ІЛ-4 і ІЛ-4Δ2 на продукцію цитокінів Т-лімфоцитами хворих на бронхіальну астму. В супернатантах Т-лімфоцитів після стимуляції з ІЛ-4 і ІЛ-4Δ2 були встановлені певні концентрації ІНФ-γ, ІЛ-6, ІЛ-10 і ФНП-α, але достовірної різниці між групами не було виявлено. Дослідження рівня фактора хемотаксису моноцитів (МХП-1) дозволило встановити статистично достовірне його зниження в дослідній та контрольній групах після активації Т-лімфоцитів з ІЛ-4. Зокрема було встановлено підвищення продукції МХП-1 Т-лімфоцитами здорових донорів і пацієнтів, хворих на бронхіальну астму, після стимуляції з ІЛ-4Δ2. Рівень експресії МХП-1 у хворих на бронхіальну астму майже не відрізнявся від показників у групі здорових осіб. Представлені дані поширюють спектр антагоністичної активності між ІЛ-4 і ІЛ-4Δ2 та обґрунтовують доцільність і перспективність подальших досліджень щодо застосування ІЛ-4Δ2 в клінічній практиці.

Інтерлейкін-4 (ІЛ-4) – плейотропний цитокін, який продукується переважно Th2-лімфоцитами, бере участь у регуляції різних функцій В-лімфоцитів, Т-лімфоцитів, макрофагів та інших гемопоетичних і негемопоетичних клітин [3]. ІЛ-4 є функціональним антагоністом цитокінів, що продукуються Th1-лімфоцитами, і інгібує деякі функції макрофагів, секрецію ними ІЛ-1, ІЛ-6, ФНП-α, здійснюючи тим самим проти-запальну дію. Експресія ІЛ-4 гена здійснюється в двох мРНК формах: 1) повнорозмірна форма, що містить послідовність усіх 4 екзонів гена і 2) мРНК форма, відома як інтерлейкін-4Δ2 (ІЛ-4Δ2), що утворюється за рахунок альтернативного сплайсингу, при якому з попередника мРНК вилучається екзон 2 [4, 6].

Особливий інтерес до ІЛ-4 і ІЛ-4Δ2 пов'язаний з їх роллю у розвитку патології людини. Літературні дані свідчать про те, що ІЛ-4 і ІЛ-4Δ2 відіграють певну роль у патогенезі багатьох захворювань, включаючи

процеси алергічної, запальної, автоімунної та інфекційної природи [1, 2, 5, 8, 10]. На теперішній час накопичилось багато даних, які свідчать про ключову роль ІЛ-4 і ІЛ-4Δ2 в патогенезі бронхіальної астми. Так, відомо, що у пацієнтів з астмою змінено загальний рівень ІЛ-4 + ІЛ-4Δ2 мРНК і співвідношення мРНК ІЛ-4/ІЛ-4Δ2. ІЛ-4 стимулює диференціювання Th0-клітин у Th2-хелпери і сприяє переключенню ізо типу В-лімфоцитів на синтез ІgE. Це призводить до гіперпродукції ІgE та гіперактивності бронхів [1, 2, 7, 9]. Проте і дотепер залишаються недостатньо з'ясованими функціональні ефекти ІЛ-4Δ2 при бронхіальній астмі.

Метою дослідження було вивчення функціональних ефектів ІЛ-4Δ2 на продукцію цитокінів Т-лімфоцитами хворих на бронхіальну астму.

Матеріали та методи

Первинні культури Т-лімфоцитів одержували з гепаринізованої крові 10 здорових до-

норів і 10 пацієнтів з бронхіальною астмою з переважанням алергічного компонента. Периферична кров була одержана шляхом венепункції. Т-лімфоцити були виділені з цільної крові методом негативної селекції з використанням RosetteSep[®] Human T Cell Enrichment Cocktail відповідно до протоколу виробника (StemCell Technologies Inc., Vancouver, British Columbia, Canada). Т-лімфоцити в концентрації 5x10⁶ клітин/см³ культивували в середовищі RPMI-1640 з 10% діалізованої фетальної бичачої сироватки, 2 мМ глютаміну, 2 мМ натрію пірувату та 1% розчину антибіотика/антимікотика в атмосфері з 5% CO₂ при 37°C.

Т-лімфоцити були активовані 100-300 нг/см³ рІЛ-4 або рІЛ-4Δ2 протягом 48 годин. Після завершення інкубації супернатанти збирали і визначали рівень цитокінів (ІНФ-γ, ІЛ-6, ІЛ-10, ФНП-α і фактор хемотаксису моноцитів (МХП-1)) методом імуноферментного аналізу (ІФА).

Статистичний аналіз даних проведено з використанням пакету прикладних програм IBM

Таблиця 1

Характеристика досліджуваної та контрольних груп донорів, n=20

Характеристика донорів	Дослідна група	Контрольна група
Загальна кількість	n = 10	n=10
Середній вік, медіана (1-й та 3-й квартилі)	46 (35, 53)	49 (40, 54)
Стать, жіноча / чоловіча	7/3	9/1
Які палять / не палять	4/6	0/10
Наявність / відсутність алергічних симптомів, по.	10/0	-
Ліки		
преднізолон, n	4	-
інгаляційні стероїди, n	8	-
Функціональні легеневі тести, медіана (1-й та 3-й квартилі)		
ФЖЄ, %	84 (75, 90)	-
ОФВ1, %	87 (64, 90)	-
ЖЄЛ, %	75 (74, 82)	-
ЗЄЛ, %	86 (81, 89)	-

Абревіатури: ФЖЄ – форсована життєва ємність; ОФВ1 – обсяг форсованого видиху за 1 секунду; ЖЄЛ – життєва ємність легень; ЗЄЛ – загальна ємність легень.

SPSS версії 19. Визначення відмінностей між групами проводили за допомогою критерію Вілкоксона при значущості $p < 0,05$.

Результати та їх обговорення*Характеристика донорів*

Контрольну групу склали 10 здорових донорів, які не хворіли на бронхіальну астму. До дослідної групи увійшли 10 хво-

рих на бронхіальну астму з переважанням алергічного компонента. Обидві групи були однорідні за віком і статтю. Детальна характеристика здорових донорів і хворих на бронхіальну астму наведена у табл. 1.

Ефекти ІЛ-4 і ІЛ-4δ2 на продукцію цитокінів Т-лімфоцитами

У даному експерименті вивчали ефекти ІЛ-4 і ІЛ-4δ2 на продукцію цитокінів Т-лімфо-

цитами здорових донорів і пацієнтів, хворих на бронхіальну астму. Визначення рівня деяких показників цитокінового профілю показало, що в супернатантах Т-лімфоцитів після стимуляції з ІЛ-4 і ІЛ-4δ2 були встановлені певні концентрації ІНФ-γ, ІЛ-6, ІЛ-10 і ФНП-α, але достовірної різниці між групами не було виявлено (табл. 2).

Дослідження рівня одного із ключових хемокінів – макрофагального хемоатрактантного протеїну (МХП-1) дозволило встановити статистично достовірне його зниження в дослідній та контрольній групах після активації Т-лімфоцитів з ІЛ-4. Зокрема, було встановлено підвищення продукції МХП-1 Т-лімфоцитами здорових донорів і пацієнтів, хворих на бронхіальну астму, після стимуляції з ІЛ-4δ2 (табл. 2, рис.). Рівень МХП-1 в супернатантах Т-лімфоцитів, активованих з ІЛ-4δ2, був достовірно вищим, ніж у контролі і суттєво вищим, ніж після активації з ІЛ-4. Слід відзначити, що рівень експресії МХП-1 у хворих на бронхіальну астму майже не відрізнявся від показників у групі здорових осіб. Аналіз впливу ІЛ-4 і ІЛ-4δ2 на експресію МХП-1 Т-лім-

Таблиця 2

Рівні цитокінів (пг/см³) у культуральних рідинах Т-лімфоцитів від здорових донорів і хворих на бронхіальну астму, n=20

Цитокіни, медіана (1-й та 3-й квартилі)	Здорові донори (n = 10)			Хворі на бронхіальну астму (n = 10)		
	контроль	pІЛ-4 (300 нг/см ³)	pІЛ-4δ2 (300 нг/см ³)	контроль	pІЛ-4 (300 нг/см ³)	pІЛ-4δ2 (300 нг/см ³)
ІНФ-γ	0.0 (0.0-5.8)	2.7 (0.4-207.6)	98.4 (0.4-472.1)	0.0 (0.0-9.7)	2.1 (0.2-7.5)	0.8 (0.0-69.5)
ІЛ-10	0.7 (0.0-18.8)	1.1 (0.2-13.1)	15.2 (0.4-106.2)	0.0 (0.0-15.3)	1.3 (0.4-9.2)	0.0 (0.0-8.2)
ІЛ-6	14.5 (8.6-112.5)	13.2 (6.8-27.8)	31.8 (16.9-118.9)	12.9 (8.0-53.1)	19.1 (9.5-27.9)	35.8 (8.2-67.3)
МХП-1	98.3 (69.8-1131.4)	*31.2 (11.9-292.8)	149.0 (50.8-2265.0)	165.0 (88.0-781.5)	*76.9 (21.0-116.1)	**208.5 (121.8-2783.8)

Примітки:

1) Т-лімфоцити від 10 здорових донорів і 10 хворих на бронхіальну астму активували pІЛ-4 або pІЛ-4δ2.

Культуральні супернатанти Т-лімфоцитів були зібрані через 48 годин інкубації і визначали концентрації цитокінів методом імуноферментного аналізу. Рівні цитокінів представлені у вигляді медіани (ймовірно відхилення);

2) * – достовірно ($p < 0,05$), нижче, ніж достовірно, нижче, ніж у контролі;

3) ** – достовірно ($p < 0,05$) вище, ніж у контролі.

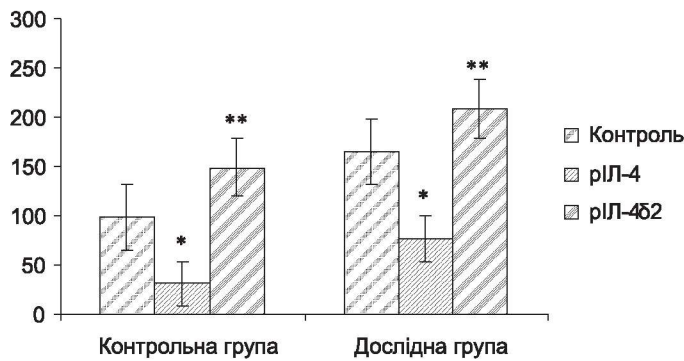


Рис. Концентрація МХП-1 в культуральних супернатантах Т-лімфоцитів. Т-лімфоцити від здорових донорів активували з рІЛ-4 або рІЛ-4δ2. Культуральні супернатанти Т-лімфоцитів були зібрані через 48 годин інкубації і визначали концентрації МХП-1. Рівні МХП-1 представлені у вигляді медіани (пг/мл).
* Достовірно ($p < 0,05$), достовірно нижче, ніж у контролі.
** Достовірно ($p < 0,05$) вище, ніж у контролі

фоцитами дозволяє зробити припущення щодо наявності функціонального антагонізму. Одержані результати співпадають з даними інших дослідників [4]

стосовно антагоністичних ефектів взаємодії ІЛ-4 і ІЛ-4δ2.

Таким чином, представлені дані розширюють спектр антагоністичної активності між

ІЛ-4 і ІЛ-4δ2 та обґрунтовують доцільність і перспективність подальших досліджень щодо застосування ІЛ-4δ2 в клінічній практиці.

ВИСНОВКИ

1. Дослідженнями встановлено, що рекомбінантний ІЛ-4 пригнічує експресію МХП-1 Т-лімфоцитами здорових донорів і хворих на бронхіальну астму.

2. Рекомбінантний ІЛ-4δ2 виявляє виражену стимулюючу дію на експресію МХП-1 Т-лімфоцитами здорових донорів і пацієнтів з бронхіальною астмою.

3. Отримані результати свідчать про перспективність досліджень функціональних ефектів ІЛ-4δ2 з метою визначення можливостей його застосування в клінічній практиці.

ЛІТЕРАТУРА

1. Дутятковская Е.М., Дзяк Г.В. // *Астма та алергія*. – 2002. – №1. – С. 19-21.
2. Чоп'як В.В., Ліщук-Якимович Х.О., Пукаляк Р.М. // *Астма та алергія*. – 2011. – №1. – С. 11-16.
3. Alms W.J., Atamas S.P., Yurovsky V.V., White B. // *Molec. Immunol.* – 1996. – Vol. 33. – P. 361-370.
4. Arinobu Y., Atamas S.P., Otsuka T. et al. // *Cell Immunol.* – 1999. – Vol. 191. – P. 161-167.
5. Dheda K., Chang J.S., Breen R.A. et al. // *AIDS*. – 2005. – Vol. 19, №15. – P. 1601-1606.
6. Gavrilenko V.A., Denisova V.V., Grishina L.V. et al. // *Bull. of experimental biol. and medicine*. – 2007. – Vol. 143, №1. – P. 72-74.
7. Glare E.M., Divyak M., Bailey M.J., Walters E.H. // *Thorax*. – 2001. – Vol. 56, №7. – P. 541-548.
8. Huang-Pin Wu, Chia-Ling Wu, Chian-Kuang Chen // *J. of Crit. Care*. – 2008. – Vol. 23. – P. 519-524.
9. Seah G.T., Gao P.S., Hopkin J., Rook G.A.W. // *Am. J. Resp. Crit. Care Med.* – 2001. – Vol. 164. – P. 1016-1018.
10. Siawaya J.F., Bapela N.B., Ronacher K. et al. // *Clin. Vaccine Immunol.* – 2008. – Vol. 15. – P. 1165-1170.

Адреса для листування: 61002, м. Харків,
вул. Мельникова, 12. Тел. (57) 706-30-97.
Національний фармацевтичний університет

Надійшла до редакції 12.03.2012 р.