

# ИЗУЧЕНИЕ ОТЗЫВЧИВОСТИ НА ДЕЙСТВИЕ ИММУНОМОДУЛЯТОРА РАСТИТЕЛЬНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ У ЛИЦ С РАЗЛИЧНЫМ ГЕНЕТИЧЕСКИМ СТАТУСОМ ПО ГЕНАМ СЕМЕЙСТВА ИНТЕРЛЕЙКИН-1

## STUDY OF RESPONSIBILITY TO THE EFFECT OF AN IMMUNOMODULATOR OF PLANT ORIGIN IN PERSONS WITH DIFFERENT GENETIC STATUS ON THE GENES OF THE INTERLEUKIN-1 FAMILY

**E. Galimova**  
**G. Galikeeva**  
**A. Galimov**  
**R. Batrshina**  
**S. Mustafina**

*Summary.* In this work, we studied the dynamics of changes in the cytokine profile of pro- and anti-inflammatory series (IL-1 $\beta$ , IL1RA, IL2, IL4, IL-6, IL10,  $\alpha$ -TNF and CRP) under: activation of whole blood cells by a mitogen ex vivo and the action of a plant immunomodulator origin of «Echinacea» in healthy individuals with different genetic status for the genes of the family of cytokines interleukin-1 (IL-1 $\beta$  (rs1143634), IL1RA(VNTR in intron 2), IL1R1(rs2287047)).

Among the examined individuals were identified with better responsiveness to the immunomodulator, which are carriers of combinations of genotypes of the interleukin-1 family (IL-1 $\beta$  (rs1143634), IL1Ra (VNTR), IL1R1 (rs2287047): CC//II//TT, CC//I //II//TT, CT//I//II//TC.

An effective response to immunomodulation is provided by the genetically determined well-coordinated work of the cytokine-antagonist-receptor system for cytokines of the interleukin-1 family, which determines the correct launch of the cytokine cascade.

*Keywords:* cytokines, mitogen induction, immunomodulator, genetic polymorphism, immune response.

**Галимова Эльвира Мансуровна**

К.б.н., доцент ФГБОУ ВО «Башкирский государственный педагогический университет им. М. Акмуллы», Уфа  
 vetgen@gmail.com

**Галикеева Гузель Фанилевна**

К.б.н., доцент ФГБОУ ВО «Башкирский государственный педагогический университет им. М. Акмуллы», Уфа  
 galikeevagf@yandex.ru

**Галимов Азат Мусавирович**

Старший преподаватель, ФГБОУ ВО «Уфимский государственный нефтяной технический университет», Уфа  
 Azat13Galimov@gmail.com

**Батршина Рината Ильшатовна**

Магистрант, ФГБОУ ВО «Башкирский государственный педагогический университет им. М. Акмуллы», Уфа  
 regi.mi@yandex.ru

**Мустафина Светлана Радмировна**

Магистрант, ФГБОУ ВО «Башкирский государственный педагогический университет им. М. Акмуллы», Уфа  
 s.mustafina98@bk.ru

*Аннотация.* В данной работе изучена динамика изменения показателей цитокинового профиля про- и противовоспалительного ряда (IL-1 $\beta$ , IL1RA, IL2, IL4, IL-6, IL10,  $\alpha$ -TNF и CRP) при: активации клеток цельной крови митогеном ex vivo и действии иммуномодулятора растительного происхождения «Эхинацея» у здоровых индивидов с различным генетическим статусом по генам семейства цитокинов интерлейкин-1 (IL-1 $\beta$  (rs1143634), IL1RA(VNTR во 2 интроне), IL1R1(rs2287047)).

Среди обследованных выявлены индивиды с лучшей отзывчивостью на иммуномодулятор, являющиеся носителями сочетаний генотипов семейства интерлейкин-1 (IL-1 $\beta$  (rs1143634), IL1Ra (VNTR), IL1R1 (rs2287047): CC//II//TT, CC//I //II//TT, CT//I//II//TC.

Таким образом, эффективный ответ на иммуномодуляцию обеспечен генетически обусловленной слаженной работой системы цитокин-антогонист-рецептор по цитокинам семейства интерлейкин-1, что определяет корректный запуск цитокинового каскада.

*Ключевые слова:* цитокины, митоген-индукция, иммуномодулятор, генетический полиморфизм, иммунный ответ.

## Введение

**В** поддержании гомеостаза организма человека непосредственное участие принимают различные звенья иммунной системы. Одними из важнейших компонентов регуляции работы иммунной системы являются такие биологически активные вещества, как гуморальные факторы иммунитета, к которым относятся цитокины [1]. Цитокины участвуют в регуляции межклеточного и межсистемного взаимодействия, влияют на дифференциацию и апоптоз клеток, стимулируют либо же подавляют рост клеток, а также участвуют в работе жизненно важных систем организма (иммунной, эндокринной, нервной) при саморегуляции и взаимодействии с внешней средой [4].

Цитокины определяют тип и длительность иммунного ответа на действие патогена [6]. Их биологический эффект на клетки реализуется как внеклеточным, так и внутриклеточным путём через взаимодействие со специфическими рецепторами, локализованными на клеточной цитоплазматической мембране [5].

Одним из главных провоспалительных цитокинов является интерлейкин 1 (ИЛ-1, IL-1), и вырабатывается многими иммунокомпетентными клетками. Клетками-мишенями являются практически все клетки организма, являющиеся основой различных органов и тканей [7].

В настоящее время для определения степени напряженности регуляторных механизмов иммунного ответа в клинической практике проводится оценка концентрации цитокинов в сыворотке крови, что лишь констатирует сам факт повышения или понижения у данного индивида без учета физиолого-биохимических и генетических особенностей [3].

Определение генетической конституции индивида порой недостаточно для выявления особенностей взаимодействия цитокинов в организме. Исследования по изучению компенсаторных возможностей иммунокомпетентных клеток при стимуляции *in vitro* и *ex vivo* являются перспективными и позволяют выявить сложные каскады и корреляционные взаимодействия между цитокинами различного спектра действия.

## Цель работы

Изучить динамику изменения показателей цитокинового профиля при активации клеток цельной крови, митогеном *ex vivo* и действии иммуномодулятора растительного происхождения «Эхинацея» у здоровых индивидов с различным генетическим полиморфизмом генов семейства интерлейкин-1.

## Материалы и методы

Обследовано 28 практически здоровых индивидов, средний возраст которых составил 30 лет. Забор венозной крови проводили утром натощак, с информированного согласия. Методом ELISA измеряли концентрацию цитокинов (интерлейкин-1 бета (IL-1 $\beta$ ), рецепторного антагониста интерлейкина-1 (IL1RA), интерлейкина-2 (IL2), интерлейкин — 4 (IL4), интерлейкин — 6 (IL-6), интерлейкин — 10 (IL10), фактор некроза опухоли и-  $\alpha$  ( $\alpha$ -TNF), С-реактивный белок (CRP), в сыворотке крови с использованием реактивов ЗАО «Вектор-бест» (Новосибирск), также была проведена стимуляция продукции цитокинов *ex vivo* посредством митоген-индукции клеток цельной крови с использованием набора «ЦИТОКИН — СТИМУЛ — БЕСТ» фирмы ЗАО «ВЕКТОР-БЕСТ» (Новосибирск, Россия), представляющий собой комплект, основными компонентами которого являются стерильная среда и комплексный митоген — смесь лиофилизированных поликлональных активаторов с последующим определением изученных цитокинов. Оценку резервных возможностей продукции цитокинов мононуклеарными клетками проводили путем расчета индекса митогенной стимуляции (соотношение индуцированного синтеза к спонтанной продукции).

Стимулирование *in vivo* проводили с помощью эндогенного иммуномодулятора растительного происхождения «Эхинацея», прошедшего лицензирование и добровольную сертификацию и разрешенный к распространению через аптечную сеть. Прием препарата осуществлялся по схеме 1 таблетке в сутки в течении 21 дня, после чего был проведен забор крови и выделена сыворотка для последующего проведения иммуноферментного анализа.

Из периферической крови у обследованных лиц была выделена ДНК с помощью метода фенольно-хлороформной экстракции [2]. Амплификацию изученных локусов проводили с помощью метода полимеразной цепной реакции (ПЦР) на амплификаторе «Терцик». Разделение продуктов амплификации проводили электрофоретическим методом в полиакриламидном геле.

Проверку нормальности распределения количественных признаков проводили с помощью критерия Колмогорова–Смирнова; равенство выборочных средних проверяли по параметрическому *t*-критерию Стьюдента. Корреляционный анализ количественных величин проводили с вычислением коэффициента корреляции Пирсона. Статистический анализ результатов проводили с использованием пакета программ SPSS17.0 для Windows.

## Результаты исследования и их обсуждение

На первом этапе исследования была проведена оценка резервных возможностей продукции цитокинов мононуклеарными клетками путем расчета индекса митогенной стимуляции.

Средние значения сывороточной концентрации провоспалительного цитокина интерлейкин-1 (IL-1 $\beta$ ) составили 63,07 $\pm$ 2,1 пг/мл, митоген-индукция показала значительный прирост и составила 116,68 $\pm$ 5,8 пг/мл, индекс митогенной стимуляции = 1,8. При анализе концентрации рецепторного антагониста интерлейкина-1 (IL1Ra) средние значения составили 766,69 $\pm$ 4,1 пг/мл, митоген-стимуляция также показала высокую продукцию 2115,02 $\pm$ 616 пг/мл, индекс митогенной стимуляции = 2,76. Уровень интерлейкина-2 (IL2) составил 2,19 $\pm$ 0,2 пг/мл до стимуляции митогеном и 102,84 $\pm$ 7,8 пг/мл после действия митогена, индекс митогенной стимуляции для IL2 показал высокие значения и составил 46,5.

Показатели С-реактивного белка (CRP) который является основным белком плазмы крови и отражает наличие острых воспалительных процессов в организме средние значение составили 0,9 $\pm$ 0,15 пг/мл, митоген-стимуляция = 1,88 $\pm$ 0,16 пг/мл, индекс митогенной стимуляции = 2,08. Полученные данные свидетельствуют о том, что индивиды, входящие в нашу выборку в момент проведения исследования были практически здоровы, так как в крови здорового человека CRP отсутствует или выявляется в минимальных количествах [7].

Средние значения интерлейкина — 4 (IL4) в сыворотке крови находились в пределах физиологической нормы 1,02 $\pm$ 0,2 пг/мл, митоген-стимуляция составила 2,15 $\pm$ 0,25 пг/мл, индекс митогенной стимуляции = 2,1. Также нами были получены интересные данные, для провоспалительных цитокинов (интерлейкин — 6 (IL-6), фактор некроза опухоли —  $\alpha$  ( $\alpha$ -TNF)) и противовоспалительного интерлейкина — 10 (IL10) индекс митогенной стимуляции составил 0,004, 0,1 и 0,33 соответственно. Возможно, это связано с активацией циркулирующих клеток крови и выраженном усилении их способности секретировать данные цитокины.

На втором этапе исследования был проведен корреляционный анализ изучаемых показателей, где была

установлена прямая взаимосвязь между спонтанной продукцией противовоспалительного цитокина IL10 и провоспалительного цитокина  $\alpha$ -TNF ( $r=0,72$ ;  $p=0,05$ ). Такую корреляцию можно объяснить тем, что IL10 способен ингибировать иммунный ответ по TH1-пути, подавляя выработку провоспалительных цитокинов [9].

На третьем этапе у здоровых индивидов с различным генетическим полиморфизмом генов семейства интерлейкин-1 (*IL-1 $\beta$*  (*rs1143634*), *IL1Ra* (*VNTR*), *IL1RI* (*rs2287047*)) был проведен анализ сывороточной продукции цитокинов, митоген-индуцированной продукции цитокина IL-1 $\beta$  клетками цельной крови и в сыворотке после приема иммуномодулятора. Индивиды с сочетаниями генотипов *CC//II//TT*, *CC//II//TT*, *CT//II//TC* оказались наиболее отзывчивыми на действие иммуномодулятора «Эхинацея», и у них регистрировалось снижение концентрации IL-1 $\beta$  и других изученных про- и противовоспалительных цитокинов до уровня физиологической нормы, что возможно можно объяснить генетически детерминированным гармоничным соотношением IL-1 $\beta$ / IL1RA и возможностью правильного запуска цитокинового каскада.

Высокие сывороточные концентрации провоспалительных цитокинов IL-1 $\beta$ , IL6,  $\alpha$ -TNF наблюдались у индивидов с сочетанием генотипов *TT//II//TC*. После приема иммуномодулятора наблюдалась нормализация продукции провоспалительных цитокинов, такой механизм возможен за счет активации клеток иммунной системы и нормализации иммунного ответа по Th1-типу [8].

У индивидов, являющихся носителями сочетаний генотипов *CC//II//TC* концентрации цитокинов после приема иммуномодулятора не снижались или снижались незначительно, несмотря на то что исходный их уровень был выше физиологической нормы.

Таким образом, прием иммуномодулятора в терапевтических дозах повлиял на выработку провоспалительных цитокинов, снизил их концентрацию за счет увеличения противовоспалительных цитокинов, уравновешивая взаиморегуляцию про- и противовоспалительных маркеров. Следует отметить, что иммунологический эффект иммуномодулятора зависит от исходного состояния иммунитета и от генетического полиморфизма индивида.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Бережная Н.М. Интерлейкины и формирование иммунологического ответа при злокачественном росте // Аллергология и иммунология. 2000. № 1. С. 45–61.
2. Бочков Н.П. Клиническая генетика // М.: Медицина, 2004. 480с.

3. Вавилин В.А., Макарова С.И., Ляхович В.В. Ассоциация полиморфных ферментов биотрансформации ксенобиотиков с предрасположенностью к бронхальной астме у детей с наследственной отягощенностью и без таковой // Генетика. 2002. Т. 38. № 4. С. 539–545.
4. Генетический паспорт — основа индивидуальной и предиктивной медицины / Под ред. В.С. Баранова. — СПб. — 2009. — 528 с.
5. Кулинский, В.И. Обезвреживание ксенобиотиков / В.И. Кулинский // Соросовский образовательный журнал. 1999. — № 1. — С. 8–12.
6. Куценко, С.А. Основы токсикологии. — СПб. — 2002. — 720 с.
7. Фрейдлин И.С., Назаров П.Г. Регуляторные функции провоспалительных цитокинов и острофазных белков // Вестник РАМН. 1999. № 5. С. 28–32.
8. Dimitrakakis C., Konstadoulakis M., Messaris E. et al. Molecular markers in breast cancer: can we use c-erbB-2, p53, bcl-2 and bax gene expression as prognostic factors // Breast. 2002. Vol. 11 (4). P. 279–285.
9. Macarthur M, Sharp L, Hold GL, Little J, El-Omar EM. The role of cytokine gene polymorphisms in colorectal cancer and their interaction with aspirin use in the northeast of Scotland // Cancer Epidemiol Biomarkers Prev. 2005. V.14(7). P. 1613–1621.

---

© Галимова Эльвира Мансуровна ( vemgen@gmail.com ), Галикеева Гузель Фанилевна ( galikeevagf@yandex.ru ),  
Галимов Азат Мусавирович ( Azat13Galimov@gmail.com ), Батршина Рината Ильшатовна ( regi.mi@yandex.ru ),  
Мустафина Светлана Радмировна ( s.mustafina98@bk.ru ).  
Журнал «Современная наука: актуальные проблемы теории и практики»

