

Biologická a krvetvorbu stimulující aktivita

IMUNORu[®]

Úvod

V 50. letech prokázal prof. Lawrence při studiu specifické buněčné imunity, že tento typ imunity lze u lidí přenést pomocí buněk – lymfocytů, ne však sérem nebo plazmou, jak je tomu u protilátkového typu imunity. Později se podařil přenos i homogenátem těchto buněk nebo faktorem, který se v průběhu krátké kultivace se specifickým antigenem uvolňoval do buněčné kultury. Látka, přenášející reakci specifické imunity z imunizovaného dárce na neimunizovaného příjemce, dostala název **transfer faktor (přenosový faktor, zkratka TF)**. TF byl původně připravován dialyzou homogenátu krevních a tkáňových leukocytů a proto byl označován jako **dialyzovaný extrakt leukocytů (zkratka DLE)**. Lze jej ovšem připravit také ultrafiltrací jako **ultrafiltrovaný extrakt leukocytů (zkratka ULE)**. Bylo prokázáno, že **DLE** a **ULE** se neliší ve své schopnosti přenášet buněčnou imunitu (Arnaudov Tziporkov 1996).

V průběhu dalších studií bylo zjištěno, že za přenos buněčné imunity je zodpovědná směs látek, které mají molekulovou hmotnost nižší než 10kD. Tento objev byl zásadní. Tím, že **TF** je složen pouze z nízkomolekulárních látek, je dáno, že tato látková směs neobsahuje transplantační antigeny, na které by mohl organismus příjemce reagovat. Z téhož důvodu nemohou být obsahem **TF** ani virové partikule. Nízkomolekulární směs látek, odpovědná za pasivní přenos buněčné imunity, nemůže být v příjemci funkčně poškozena ani z něj vyloučena alogenní nebo xenogenní transplantační reakcí. To znamená, že na jedné straně může mít přenesená imunita dlouhodobé trvání a na straně druhé lze uskutečnit i mezidruhový (xenogenní) přenos.

Prvé práce s **TF** a také většina klinických aplikací **TF** používaly jako výchozí surovinu pro jeho přípravu homologní leukocyty lidské krve (Lawrence 1976, Pekárek a spol. 1986, 1991, 1993, Kirkpatrick a spol. 1983). Pozitivní léčebné výsledky byly však popsány také při použití **TF** zhotoveného ze splenocytů myši (Alvarez-Thull a Kirkpatrick 1996, Raise a spol. 1996), bovinní krve (Huo Baolai a Wu Jingxin 1991, Krejčí a spol. 1991, Meduri a spol. 1996), splenocytů vepřů (Li Chong-Bi a spol. 1990) a kachní krve (Liu Kui a Liu Wen, 1990). S ohledem na skutečnost, že většinu aktivit **TF** lze přenášet mezi jednotlivými živočišnými druhy včetně člověka (Klesius a spol. 1987, Wilson a Fort 1987), poskytují **TF** připravené z leukocytů krve zvířat širší základnu pro přípravu léčivých substancí této skupiny pro aplikaci v humánní medicíně (Arnaudov a Tziporkov 1996, Chen De-yuan a spol. 1991, Pekárek 1993, Raise a spol. 1996, Meduri a spol. 1996).

Během studií různých typů imunomodulačních vlastností látek této skupiny došlo posléze k ustálení terminologie v tom smyslu, že název **transfer faktor (TF)** je v současnosti používán převážně pro skupinu preparátů, připravených specifickou imunizací, zatímco pro dialyzáty či ultrafiltráty leukocytů zdravých jedinců jsou používány termíny **dialyzovaný leukocytární extrakt (DLE)** nebo **ultrafiltrovaný leukocytární extrakt (ULE)**. V dalším textu se budeme podrobněji zabývat právě posledně zmíněnými preparáty, pocházejícími od zdravých jedinců.

DLE a **ULE** jsou, jak již bylo výše uvedeno, směsí látek, a jsou tudíž definovány pouze svou molekulovou hmotností (<10 kDa), nikoliv chemicky. Do dnešního dne byla v **DLE** a **ULE** prokázána přítomnost přibližně 200 různých látek. Určitým problémem zůstává to, že doposud nebyly v této směsi definovány látky, které jsou přímo zodpovědné za biologické účinky a klinické úspěchy preparátů. V oblasti znalostí efektů je dále nutno podrobněji zmapovat bohaté spektrum účinnosti **DLE** a **ULE**.

V České republice se používá v klinické praxi jednak dialyzovaný leukocytární extrakt (**DLE**) lidských leukocytů, **IMMODIN**[®] (výrobce SEVAC, a.s.), jednak ultrafiltrovaný leukocytární extrakt (**ULE**) leukocytů vepřů **IMUNOR**[®] (výrobce Imunomedica, a.s.). Klinické aplikace **IMODINu**[®] shrnuli Pekárek a spol. (1996). Jednou z nespecifických aktivit **IMODINu**[®] je jeho krvetvorbu stimulující aktivita (Barnet a spol. 1991, Vacek a spol. 1993, 1997, 2000). Předmětem studie prezentované zde bylo ověření krvetvorbu stimulující aktivity ultrafiltrátu leukocytů krve vepřů - **IMUNORu**[®].

Materiál a metody

Pokusnými zvířaty byly samice myší ICR ve stáří 8-12 týdnů. Experimenty byly uskutečňovány v souladu se zákony a vyhláškami na ochranu zvířat a schváleny Resortní odbornou komisí Akademie věd ČR.

Testovaným preparátem byl **IMUNOR**[®]. **IMUNOR**[®] je lyofilizovaný ultrafiltrát homogenátu desintegrovaných bílých krvinek zdravých vepřů. Tabletový materiál **IMUNORu**[®]s účinnou látkou 10mg Transferei factor suillus je dodáván v jedné lahvičce. Jako rozpouštědlo je doporučena pitná voda. Látka je určena pro humánní perorální aplikaci. Jedna tableta obsahuje ultrafiltrát z 2×10^{10} leukocytů. Pro experimentální účely byl **IMUNOR**[®] rozpuštěn ve sterilní destilované vodě krátce před použitím a určené množství látky bylo *in vivo* aplikováno intraperitoneálně (i.p.) v objemu 0,2 ml., nitrožilně (i.v.) v objemu 0,2 ml nebo perorální sondou (p.o) v objemu 0,4 ml. *In vitro* byl **IMUNOR**[®] přidáván do media pro kultivaci krvetvorných buněk metodou tkáňových kultur v koncentraci 2 ng/ml.

Toxické účinky **IMUNORu**[®] byly zjišťovány po i.v. nebo i.p. injekci. Bylo zaznamenáváno chování a úhyn zvířat do 3. dne po aplikaci. Jelikož v širokém rozmezí použitých dávek **IMUNORu**[®] nebyly po i.p. ani i.v. aplikaci zjištěny úhyny ani změny v chování myší, účinek p.o. aplikace nebyl zjišťován.

Krvetvorbu stimulující efekty IMUNORu[®] byly testovány souborem in vitro a in vivo metod. Oběma uvedenými přístupy byla zjišťována schopnost **IMUNORu[®]** ovlivňovat proliferaci a diferenciaci krvetvorných progenitorových buněk pro granulocyty a makrofágy (GM-CFC): a) metodou kultivace ve tkáňové kultuře bylo stanovováno **množství GM-CFC v kostní dřeni femuru** myší, jimž byl podáván **IMUNOR[®]**, b) stejnou technikou byla testována schopnost **IMUNORu[®]** samotného nebo séra myší, jimž byl **IMUNOR[®]** aplikován, indukovat proliferaci GM-CFC normální, neovlivněné kostní dřeně. V těchto pokusech se využívala schopnost GM-CFC vytvářet ve vhodném in vitro prostředí makroskopické kolonie buněk diferencujících se ve směru granulocytů a makrofágů. Experimenty popsané ad b) byly postaveny ve dvou variantách. V první variantě byla testována schopnost indukce proliferace GM-CFC samotným **IMUNORem[®]** nebo samotným sérem po aplikaci **IMUNORu[®]**, t.j. bez přítomnosti dalších krvetvorbu stimulujících faktorů; takto byly získány informace o parametru, označovaném jako **kolonie stimulující aktivita (CSA)**. Ve druhé variantě byly **IMUNOR[®]** nebo sérum myší, jimž byl aplikován **IMUNOR[®]**, přidávány ke kulturám buněk kostní dřeně, obsahujícím rovněž další krvetvorbu stimulující faktor, nejčastěji interleukin-3 (IL-3); tento další faktor byl v kulturách obsažen v suboptimální koncentraci (třicetiprocentní koncentraci ve srovnání s koncentrací, vyvolávající maximální efekt), aby bylo možno posoudit, zda **IMUNOR[®]** či sérum po aplikaci **IMUNORu[®]** jsou schopny potencovat účinek dalšího faktoru; takto byl získán parametr, označovaný jako **kostimulační aktivita (CoSA)**. Použité hematologické metody jsou detailně popsány v práci Vacka a spol. (2002).

Výsledky

Toxicita IMUNORu[®]

Výsledky uvedené v Tab. 1 dokumentují, že v širokém rozsahu dávek **IMUNORu[®]** (5,0 mg/kg až 480 mg/kg, t.j. 0,125 mg/myš až 12 mg/myš)

nedocházelo do třetího dne k úhynu myší po i.v. ani i.p. aplikaci. Účinky aplikace p.o. nebyly vzhledem k tomuto nálezu a vzhledem k vysoké spotřebě testované substance při dalších případných experimentech ověřovány. V průběhu pokusů nebyly rovněž zjištěny žádné změny v chování myší. Lze tedy konstatovat, že **IMUNOR[®]** je prakticky netoxický.

Tab.1 Úhyn myší do 3 dne po nitrožilní (i.v.) a intraperitoneální (i.p.) injekci IMUNORu[®]

Dávka IMUNORu [®] (mg/myš)	i.v. injekce			i.p. injekce		
	podáno	přežilo	%	podáno	přežilo	%
0.125	3	3	100	3	3	100
0.250	3	3	100	3	3	100
0.500	3	3	100	3	3	100
1.00	3	3	100	3	3	100
3.00	3	3	100	3	3	100
6.00	3	3	100	3	3	100
9.00	3	3	100	3	3	100
12.0	3	3	100	3	3	100

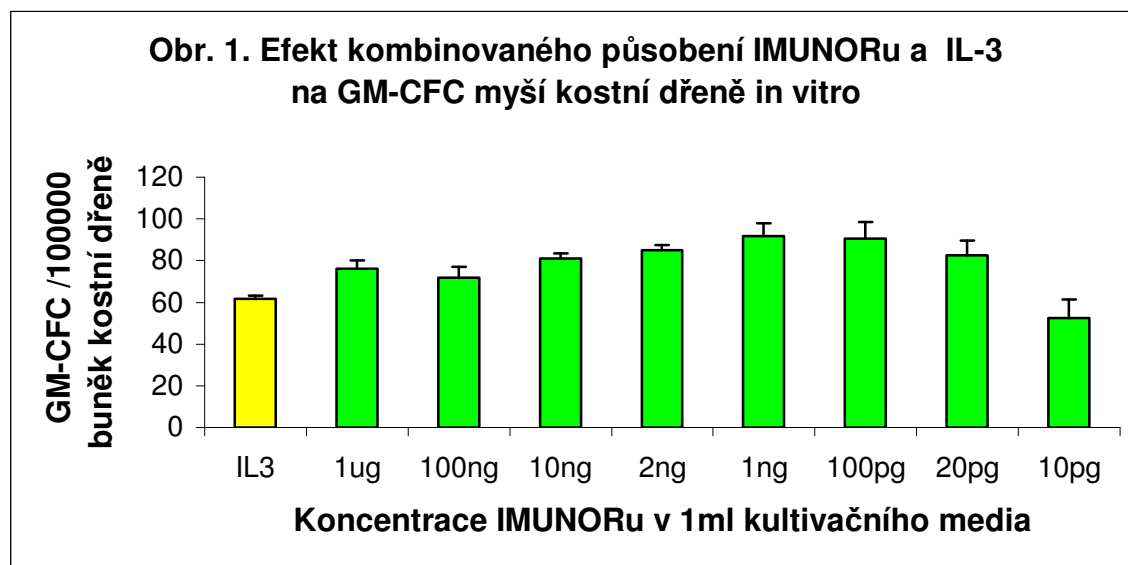
Krvetvorbu stimulující aktivita IMUNORu[®]

Schopnost IMUNORu[®] indukovat proliferaci progenitorových buněk pro granulocyty a makrofágy (GM-CFC) kostní dřeně in vitro

IMUNOR[®], přidaný v různých koncentracích in vitro k suspenzi buněk normální, t.j. neovlivněné myší kostní dřeně v kultuře, která neobsahuje další krvetvorbu stimulující faktor, nebyl schopen samostatně stimulovat proliferaci GM-CFC a nevykazoval tedy stimulační aktivitu (CSA).

Byl-li však **IMUNOR[®]** přidán ke kultuře buněk, obsahující rovněž suboptimální koncentraci IL-3, zvyšoval počty kolonií vznikajících proliferací

GM-CFC nad úroveň účinku samotného IL-3 (obr.1).



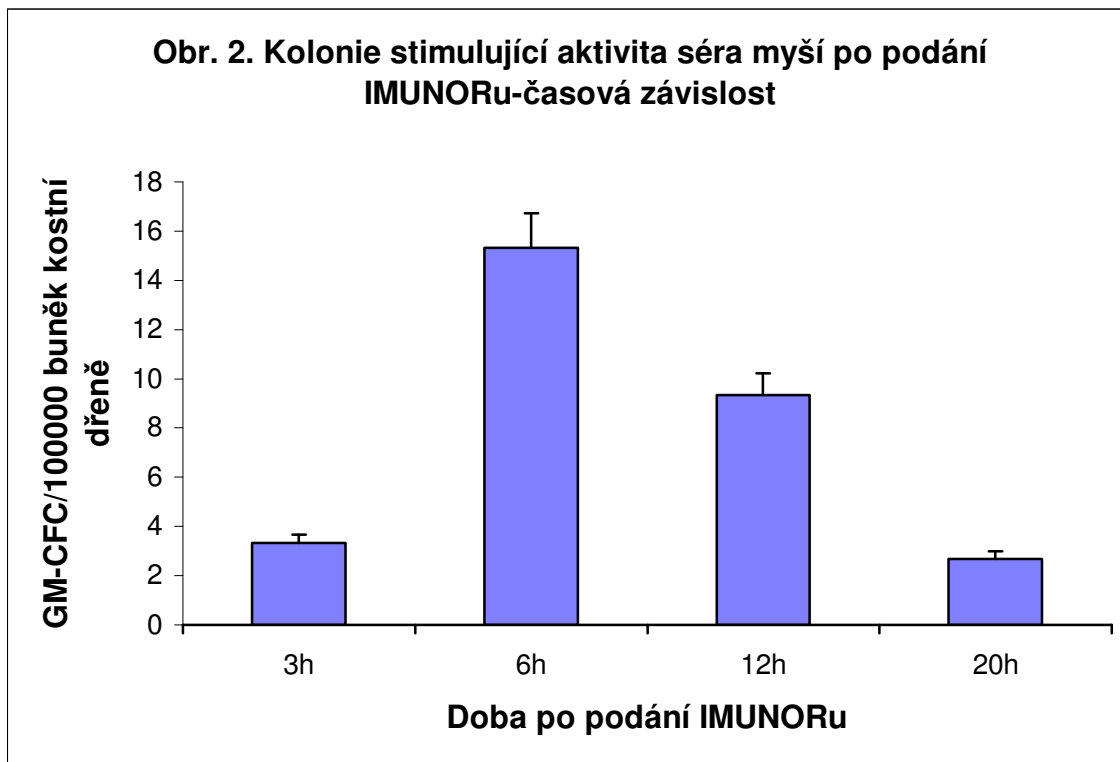
Žlutý sloupec: efekt samotného IL-3. Zelené sloupce: efekty kombinovaného působení IL-3 a příslušné koncentrace **IMUNORu**[®].

Tyto výsledky prokazují kostimulační aktivitu (CoSA) **IMUNORu**[®] na proliferaci GM-CFC myší kostní dřeně. Statisticky významné ($P < 0,01$) zvýšení počtu GM-CFC v přítomnosti **IMUNORu**[®] ve srovnání s kulturami obsahujícími pouze IL-3 bylo pozorováno u koncentrací **IMUNORu**[®] v rozsahu 10 ng/ml - 20 pg/ml.

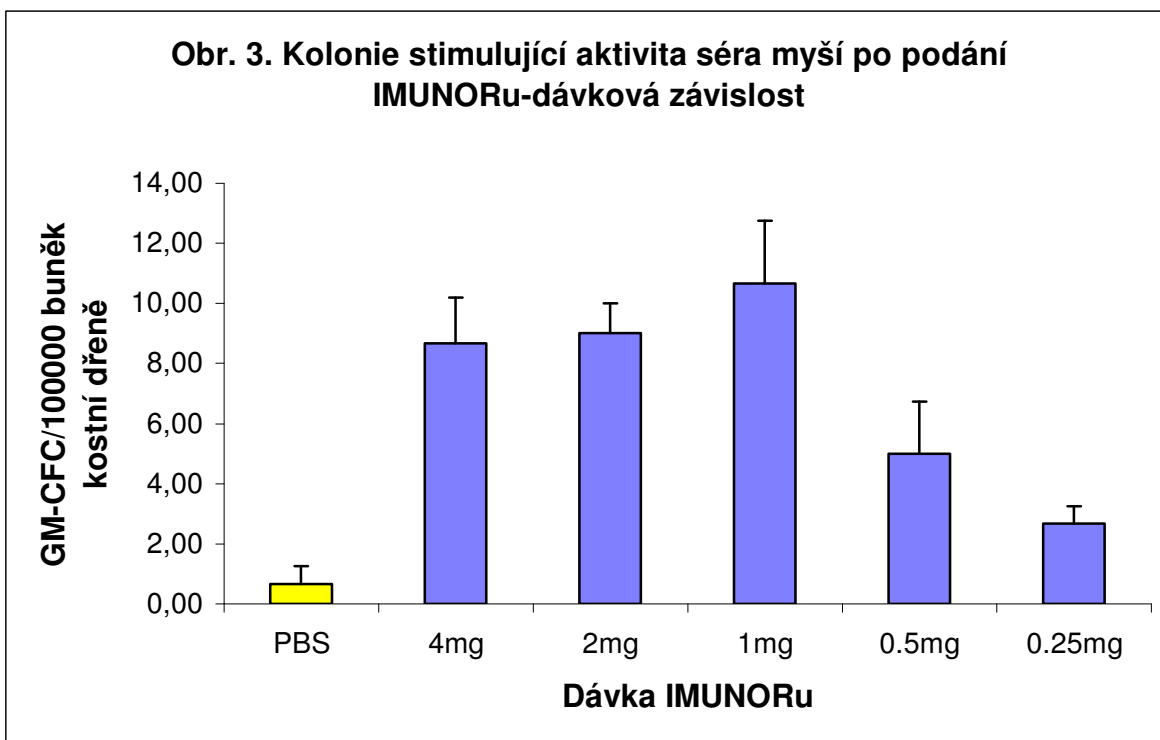
Schopnost IMUNORu[®] indukovat proliferaci progenitorových buněk pro granulocyty a makrofágy (GM-CFC) kostní dřeně in vivo

Stanovení CSA: Pokusným zvířatům byl podán **IMUNOR**[®]. V určených intervalech po aplikaci **IMUNORu**[®] byl proveden odběr krve a připraveno sérum, u kterého byla in vitro zjišťována schopnost ovlivnit proliferaci GM-CFC, projevující se tvorbou kolonií buněk, bez přítomnosti dalšího krvinek stimulačního faktoru. Kontrolní sérum myší ovlivněných pouze injekcí fyziologického roztoku nestimulovalo po přidání do kultivačního media suspenze buněk kostní dřeně tvorbu kolonií, vznikajících proliferací GM-CFC. Sérum od myší odebrané v různou dobu po perorální aplikaci 1 mg **IMUNORu**[®]

a přidané do suspenze buněk kostní dřeně neobsahující další krvetvorbu stimulující faktor, indukovalo tvorbu kolonií, vznikajících proliferací GM-CFC t.j. vykazovalo CSA. Tvorba kolonií byla pozorována již po přidání sér odebraných v celém sledovaném intervalu mezi 3 a 20 hod po aplikaci (obr. 2).

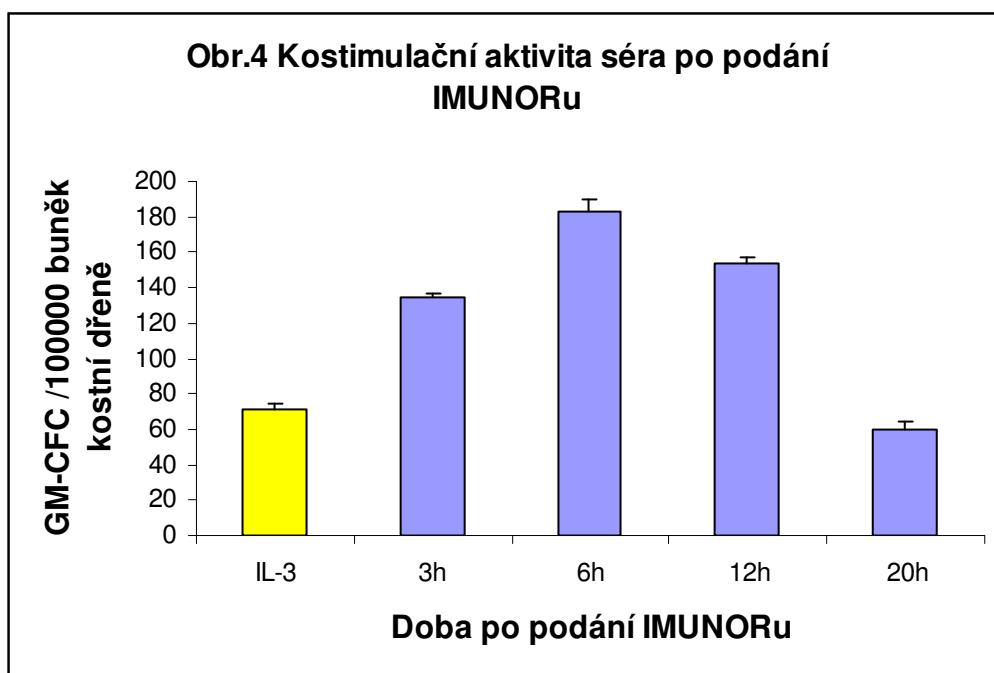


Na obr. 3 je uvedena dávková závislost počtu vytvořených kolonií, vznikajících proliferací GM-CFC, po přidání séra myší, odebraného za 6 hod po p.o. aplikaci různého množství **IMUNORu**[®], ke kultuře buněk myší kostní dřeně. Jako kontrola bylo použito sérum od myší, kterým bylo podáno 0,4 ml fyziologického roztoku (PBS).



Výsledky dokumentují nejvyšší stimulační účinnost (CSA) séra po aplikaci **IMUNORu**[®] při dávce 1 mg/myš (40mg/kg). Tato dávka **IMUNORu**[®] byla proto použita jako základní dávka pro studium krvetvorbu stimulující aktivity **IMUNORu**[®] in vivo (viz kapitola Vliv **IMUNORu**[®] na počty progenitorových buněk pro granulocyty a makrofágy (GM-CFC) v kostní dřeni).

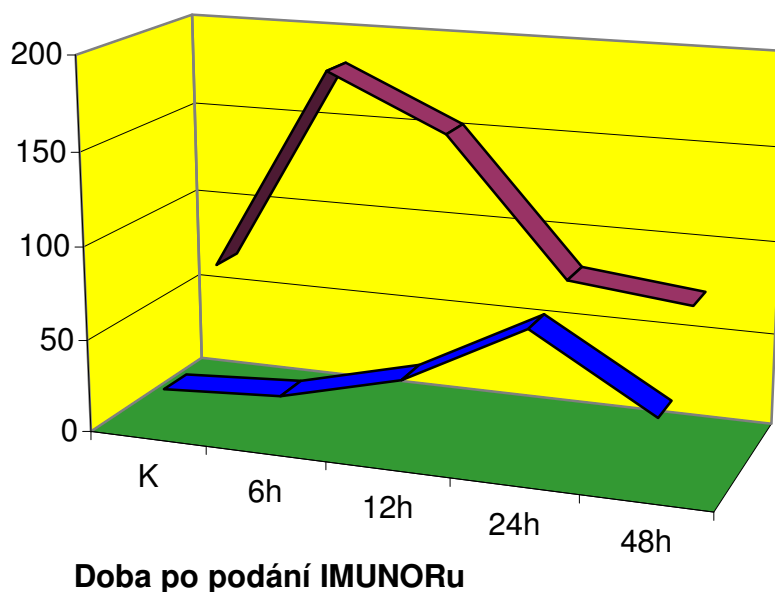
Stanovení CoSA: Podání **IMUNORu**[®], odběry krve a příprava séra byly provedeny, jak je popsáno v odstavci Stanovení CSA. Schopnost ovlivnit proliferaci GM-CFC však byla v tomto případě testována v kulturách kostní dřene, obsahujících rovněž IL-3 ve suboptimální koncentraci. Výsledky jsou shrnuty na obr. 4. Sérum od myší odebrané v intervalu mezi 3 a 12 hod po injekci 1 mg **IMUNORu**[®], statisticky významně ($P < 0,01$) zvyšovalo počty kolonií, vznikajících proliferací GM-CFC, ve srovnání s kontrolními kulturami obsahujícími pouze IL-3.



Vliv **IMUNORu**[®] na počty progenitorových buněk GM-CFC v kostní dřeni: Pokusným myším byl podán **IMUNOR**[®] p.o. nebo i.p. v dávce 1 mg. Kontrolní zvířata dostala fyziologický roztok. Kromě počtů GM-CFC byla také zjišťována celková buněčnost kostní dřene femuru. Za 24 hod. po podání **IMUNORu**[®] bylo nalezeno mírné zvýšení buněčnosti kostní dřene a statisticky významné ($P < 0,01$) zvýšení počtu GM-CFC v kostní dřeni femuru pokusné skupiny myší, a to jak v případě p.o., tak i.p. aplikace. Výsledky jsou shrnuty v tab. 2.

Obr. 5 ilustruje časovou provázanost mezi CSA séra a nárůstem počtu GM-CFC v kostní dřeni po p.o. aplikaci **IMUNORu**[®]. V první fázi, 6 až 12 hod po podání **IMUNORu**[®] dochází ke zvýšení CSA séra. Poté navazuje druhá fáze krvetvorbu stimulujících efektů **IMUNORu**[®], kdy 24 hod po jeho podání vrcholí nárůst počtů GM-CFC. Vzhledem k tomu, že GM-CFC představují zdroj diferencovaných funkčních buněk – granulocytů a makrofágů,

Obr. 5. Kolonie stimulující aktivita séra a počty GM-CFC ve femuru po podání IMUNORu



(modrá křivka: počet GM-CFC v kostní dřeni femuru; červená křivka: kolonie stimulující aktivita séra)

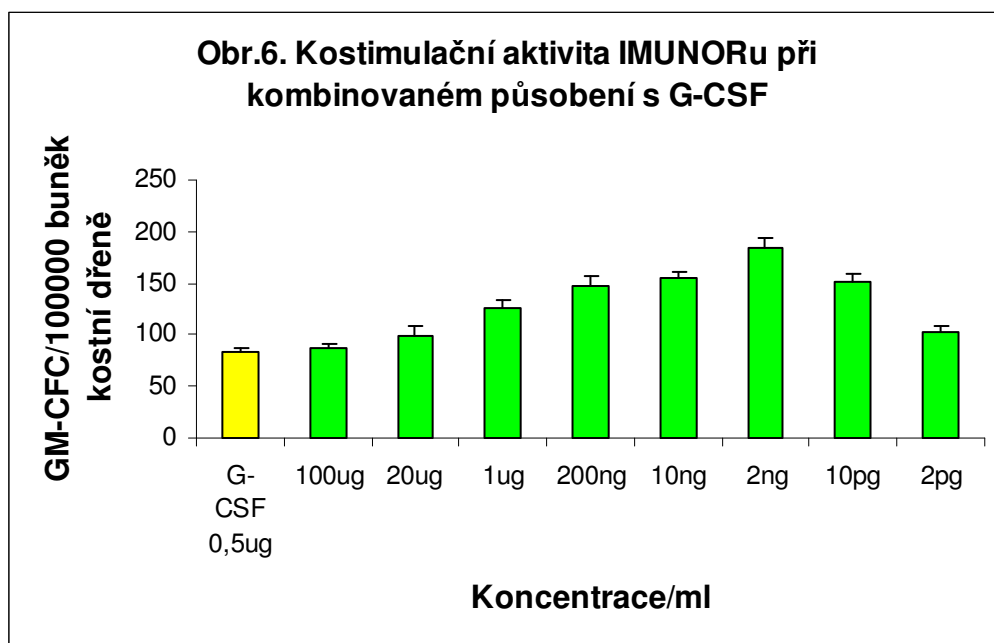
kteřé mají nezastupitelnou úlohu v řadě imunitních funkcí, představuje nárůst počtů GM-CFC důležitý efekt terapie **IMUNORem[®]**.

Tab. 2. Buněčnost kostní dřene-femuru- a počty GM-progenitorů ve femuru u normálních-neozářených myší (n= 5 zvířat)

	Buněčnost kostní dřene (x 10 ⁶) % zvýšení		GM-CFC /femur (x 10 ³) % zvýšení	
Kontrola	10.20 ± 0.2	-	9.75 ± 0.21	-
IMUNOR 24 hod				
p.o.	9.4 ± 0.10	107	29.32 ± 0.10^a	286
i.p.	10.23 ± 0.02	117	36.49 ± 0.06^a	355

^a – příslušná hodnota je statisticky významně (P<0,01) vyšší ve srovnání s hodnotou kontrolní

Kostimulační vliv **IMUNORu**[®] na krvetvorbu stimulující aktivitu různých cytokinů in vitro: **IMUNOR**[®] byl v širokém spektru koncentrací testován

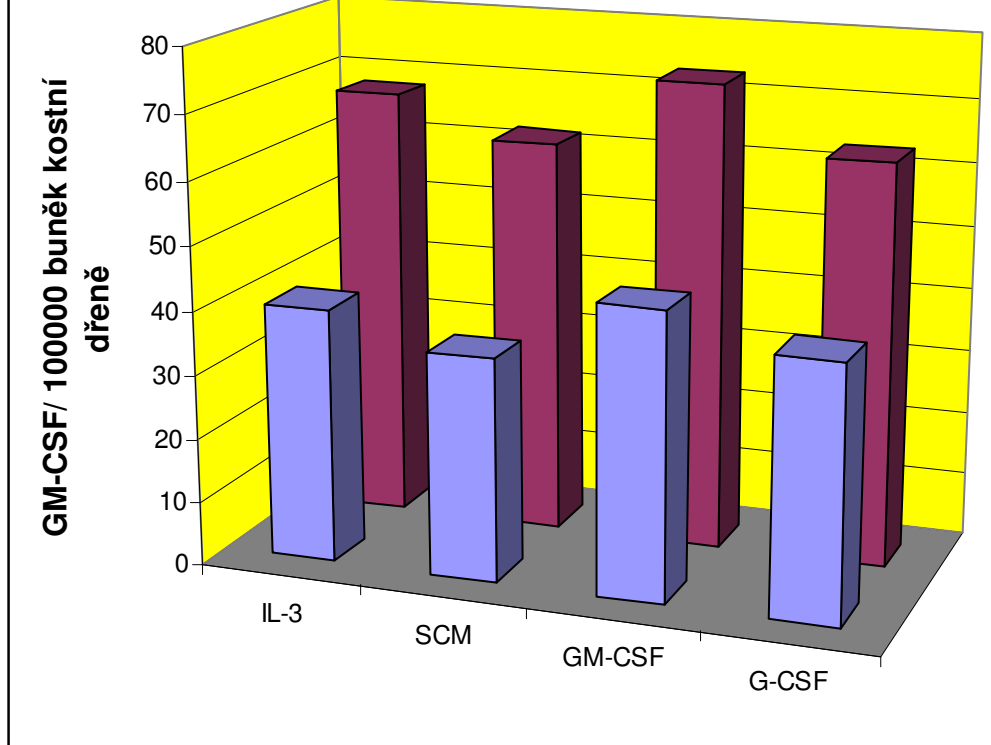


(žlutý sloupec: efekt samotného G-CSF (0,5 $\mu\text{g/ml}$); zelené sloupce: efekty kombinovaného působení 0,5 $\mu\text{g/ml}$ G-CSF a příslušných koncentrací **IMUNORu**[®])

z hlediska schopnosti potencovat efekty granulocytárního kolonie stimulujícího faktoru (G-CSF), přítomného v kultuře v koncentraci 0,5 $\mu\text{g/ml}$, na GM-CFC normální, neovlivněné kostní dřeni in vitro. Výsledky, které ukazují obr. 6, dokumentují schopnost **IMUNORu**[®] zvyšovat počty kolonií, vznikajících proliferací progenitorových buněk GM-CFC, indukované stimulačním účinkem G-CSF, s maximem účinnosti v rozsahu koncentrací 2 až 200 ng/ml.

Na obr.7 je uveden kostimulační účinek **IMUNORu**[®] (2ng/ml) na indukci tvorby kolonií, vznikajících proliferací progenitorových buněk pro granulocyty a makrofágy (GM-CFC), suboptimálními koncentracemi různých cytokinů, a to interleukinu-3 (IL-3), stem cell faktoru (SCF), granulocytárního/makrofágové-

Obr.7. Kostimulační aktivita IMUNORu při kombinovaném působení s IL-3,SCF,GM-CSF a G-CSF



(modré sloupce: efekty samotných krvinek stimulačních faktorů v suboptimálních koncentracích; fialové sloupce: efekty kombinovaného působení **IMUNORu**[®] (2 ng/ml) a příslušných faktorů)

ho kolonie stimulačního faktoru (GM-CSF) a granulocytárního kolonie stimulačního faktoru (G-CSF).

Závěr

Uvedené výsledky dokumentují zvýšení proliferační aktivity progenitorových buněk pro granulocyty a makrofágy (GM-CFC) v kostní dřeni myši, kterým byl aplikován i.p. nebo p.o. **IMUNOR**[®]. V séru pokusných zvířat se po podání **IMUNORu**[®] schopnost zvyšovat proliferační aktivitu dřevových GM-CFC a indukovat tak tvorbu makroskopických kolonií krvetvorných buněk. **IMUNOR**[®] samotný i séra myši, jimž byl

IMUNOR[®] podán mají kostimulační aktivitu in vitro, t.j. schopnost potencovat účinek různých krvinek stimulačních faktorů (IL-3, SCF, GM-CSF a G-CSF) na tvorbu kolonií, vznikajících proliferací GM-CFC. Zvýšení počtu progenitorových buněk pro granulocyty a makrofágy (GM-CFC) v kostní dřeni pokusných zvířat, jimž byl podán IMUNOR[®], může tato zvířata činit odolnějšími proti působení myelotoxických faktorů, jakými jsou například ionizující záření nebo cytostatická terapie. Tato zjištění mají rovněž klinický význam, protože upozorňují na indikační možnosti pro podání IMUNORu[®] v situacích poškozené krvetvorby a imunitního systému, spojených s rizikem obtížně zvladatelných infekčních stavů.

Literatura-Publikace :

Vacek A., Hofer M., Hromas J., Lukšíková E., Svoboda J., Schneiderová H.:

HEMOPOIESIS –STIMULATING EFFECTS AND ENHANCED SURVIVAL OF IRRADIATED MICE AFTER PERORAL OR INTRAPERITONEAL ADMINISTRATION OF ULTRAFILTERED PIG LEUKOCYTE EXTRACT (UPLE, IMUNOR[®]). Immunopharmacology and Immunotoxicology, vol. 24, No. 4, 651-664, 2002.