

D'yakonava V.A., Burokov V.V., Dambaeva S.V., Pinegin B.V.

Výskum mechanizmu účinku imunomodulátora polyoxidonia na bunkovej a molekulárnej úrovni na bunkách periférnej krvi človeka in vitro

Štátny vedecký ústav – Inštitút imunológie MZ RF, Moskva

Polyoxidonium (PO) predstavuje imunomodulačný preparát, ktorý už v priebehu siedmich rokov je používaný lekármi alergológmi - imunológmi pri liečení druhotných imunodeficitných stavov (1, 2, 6, 13). Taktiež imunomodulátor sa používa pri liečení akútnych infekčných procesov (14). Široké spektrum jeho liečebného efektu je určované spojením imunomodulačných vlastností s detoxikačnými, antioxidačnými a membranoprotektornými vlastnosťami. Polyoxidonium predstavuje fyziologicky aktívnu vysokomolekulárnu látku. Z chemickej stránky pohľadu je to kopolymer N - oxidu - 1,4 - etylénpiperazínu a (N - karboxietyl) - 1,4 - etylénpiperazínia bromidu so strednou molekulovou hmotnosťou Mw - 100kD. Preparát bol vyvinutý v Štátnom vedeckom ústave - Inštitúte imunológie MZ RF kolektívom autorov Petrovom R.V., Chaitovom R.M., Nekrasovom A.V., Ataulachanom R.I., Puchkovou N.G., a Ivanovou A.S. (9, 11).

Táto práca je zameraná na sledovanie mechanizmu účinku polyoxidonia na bunkovo - molekulárnej úrovni. Našou úlohou bolo nájsť cesty aktivácie terčových buniek pod účinkom polyoxidonia a skúmať vplyv preparátu na ich základné funkčné charakteristiky.

Materiál a metódy.

Separácia leukocytov na želatíne.

V silikonóvu skúmavku so 4 ml heparinizovanej krvi sme pridali 2 ml 3% želatíny vo fosfátno solnom pufri (FSP) s pH 7,4 ; inkubovali sme v priebehu 10 - 15 minút pri 37 °C z dôvodu sedimentácie erytrocytov. Následne sme leukocyty získané z nedsedimentačného roztoku premývali dvakrát s FSP.

Príprava polyoxidonia značeného fluoresceín-5-isothiocyanatom (FITC).

Syntézu polyoxidonia (PO, OOO Immafarma, Moskva), značeného s FITC (F - PO), (Sigma), sme uskutočnili podľa metodiky opísanej Godingom J.W. (31) v 0,1 M roztoku bikarbonata natria. Následne sme vykonali dialýzu zmesi v membránových trubičkách (Spectrapor, m w cut off ~ 3.500) oproti vode s osemnásobnou zmenou dializačnej kvapaliny. Dializačné vody neobsahovali FITC, čo odpovedalo aj neprítomnosti adsorpcie pri λ - 494 nm. To poukazuje na úplne naviazanie komponentov výslednej reakcie. Následné bol značený preparát F - PO lyofilne vysušený. Na 1 mg PO v konjugáte pripadá 20 μ g FITC.

Hodnotenie vzájomného pôsobenia leukocytov s polyoxidoniom.

Bunkovú suspenziu privedenú do koncentrácie 2×10^6 buniek/ml sme inkubovali pri 37°C s F - PO pri piatich rozličných koncentráciách (100, 200, 500, 1000 a 2000 $\mu\text{g/ml}$) od 1 do 5 hodín. Reakciu sme uskutočnili v 96 priehlbinkovej planžete použitím 100 μl bunkovej suspenzie a F - PO. Po ukončení inkubácie neviazaný s leukocytami F - PO sme premývali fosfátno solným pufrom. Pre lepšiu detekciu monocytov na prietokovom cytometre sa bunková suspenzia dodatočne značila fikoerytrinovou anti - CD14 - protilátkou v priebehu 15 minút pri izbovej teplote a v tme. Neneviazané anti - CD14 - AT sme premývali FSP. Následne sme lyzovali erytrocyty 200 μl ochladeným lýzatným roztokom 0,15 M chloridu amónia (Reachim) , leukocyty sedimentovali a premývali FSP. Analýzu vzoriek sme uskutočnili pomocou prietokového cytofluorimetra FACS Calibur s argónovým laserom s dĺžkou vlny 488nm v programe „ CellQuest „. Podľa dvoch parametrov, predného (FSC) a bočného (SSC) rozptylu v okne Dot Plot sme určovali tri oblaky buniek - monocyty, neutrofilý a lymfocyty, kde sme analýzou stanovovali strednú geometrickú intenzitu fluorescencie (Geo Mean) na kanále FL - 1.

Príprava vzoriek pre elektrónomikroskopické sledovanie.

V práci sme použili komplex koloidného zlata a polyoxidonia (Au - PO), [PO - 200 $\mu\text{l/ml}$, koloidné zlato HAuCl_4 (Sigma, 10 nM) ; 30 iónov zlata na jednu molekulu PO]. Suspenziu leukocytov, ktorú sme separovali na želatíne a priviedli do koncentrácie 2×10^6 buniek/ml sme inkubovali s Au - PO v rovnakých objemoch v priebehu 60 minút pri 37°C . Reakciu sme uskutočnili v cytometrických skúmavkách v objeme 2 ml. Po inkubácii sme zo suspenzie odstránili erytrocyty lýzujúcim roztokom 0,15 M chloridu amoneho (Reachim) a dvakrát sme ho premyli FSP. Následne sme bunky centrifugovali pri 200g 5 minút; supernatant sme odstránili a bunky stabilizovali v 2 ml 2,5% glutamat aldehydu (Merck) vo FSP v priebehu 2 hod. pri 4°C . Potom sme opatrne odstránili glutamat aldehyd a vymenili ho za 2 ml 1% roztoku oxidu osmia (OsO_4), (Sigma), dodržiavajúc predchádzajúce podmienky inkubácie v chlade. Následne sme dehydratovali materiál prevádzajúc ho cez narastajúcu koncentráciu alkoholu podľa štandardnej metódy. Posledná inkubácia pred zaliatím - v troch smenách acetómom v priebehu 30 minút. Zaliatie do eponovej zalievajúcej zmesi (Serva); tu sme vykonávali taktiež podľa štandardnej metódy. Potom sme materiál udržiavali v čistej zalievajúcej zmesi alebo vkladali ho do zalievajúceho objemu. Polymerizácia sa uskutočnila v priebehu 24 hodín pri 37°C a dva dni pri teplote 60°C . Ultra tenké rezy sme prichystali na ultrazväzku LKB - IV, kontrastovali vodným uranyl acetómom a taktiež citratom olova podľa Reynoldsa a následne skúmali pod elektronovým mikroskopom Jeol - 100B.

Hodnotenie tvorby vnútrobunkového kalcia leukocytmi.

Tvorbu vnútrobunkového kalcia (Ca^{2+}) leukocytami periférnej krvi sme hodnotili pomocou prietokovej cytometrie, využívajúc farbičku Fluo - 3 (20). Pre ohodnotenie vplyvu polyoxidonia na vnútrobunkový Ca^{2+} sme použili 100 μl leuko-suspenzie , ktorú sme priviedli do koncentrácie 2×10^6 buniek/ml pre neutrofilý fosfátno solným pufrom. Odstránili sme erytrocyty lýzujúcim roztokom 0,15 M chloridom amónia (Reachim) a dvakrát premývali s 700 μl FSP; čisté leukocyty v objeme 50 μl sme inkubovali s Fluo - 3 pri koncentracii 3 μM v priebehu 30 minút a pri 37°C . Reakcia prebiehala v cytometrických skúmavkách. Po inkubácii sme leukocyty sedimentovali, následne sme dvakrát premývali 500 μl teplým FSP a s 500 μl teplého roztoku Henksa. Opakovanú inkubáciu sme uskutočnili

s 500 µl teplého roztoku Henksa v priebehu 30 minút pri 37 °C . Z dôvodu ustálenia kalciovej rovnováhy sme po skončení inkubácie vzorky ponechali ešte 30 minút pri 37 °C pridajúc 500 µl teplého roztoku Henksa. Kvalitatívnym kritériom fungovania systému sa využíva klasický stimulátor vnútrobunkového Ca^{2+} - kalciový iónofor A23187 v koncentrácii 1 µg/ml, ktorý tak ako polyoxidonium (200 µg/ml), sme pridávali k vzorkám pred uskutočnením analýzy na cytometre. Analýzu vzoriek sme uskutočnili pomocou prietokového cytometra s využitím programového zabezpečenia „ CellQuest „. Meranie sa vykonávalo po dobu 10 minút pri 37 °C. Kvalitatívnu kvapalinu, ktorou sme umývali zadržiavaciu ihlu cytometra sme použili „ optimized sheath fluid FACS Flow „, predstavujúci pufrováci roztok (41). Princíp identifikácie vnútrobunkového Ca^{2+} je založený na zadržaní bunkou acetoximetyl éterickej formy farbičky Fluo - 3 s následným odštiepením éteru cytoplazmatickými esterázami spôsobujúcimi vytvorenie Ca^{2+} citlivej formy farbičky. Na obrazovku sme naniesli okno Dot Plot s dvomi parametrami FL - 1 a času v sekundách. Detekciu spontánej tvorby Ca^{2+} sme sledovali v priebehu 2,5 minúty, potom sme pridali PO alebo kalciový iónofor A 23187 a pozorovali sme stimulovanú produkciu vnútrobunkového Ca^{2+} neutrofilmi a lymfocytmi v priebehu nasledujúcich 8 minút. Hodnoty monocytov sme nesníмали nakoľko sa v Ca^{2+} - obsahujúcom prostredí tieto bunky dobré prilepujú na plastiku.

Hodnotenie produkcie vnútrobunkového peroxidu vodíka (H_2O_2).

Peroxid vodíka sme určovali pomocou dichlórfluoresceína diacetátu (DCF - DA), (Sigma), (18,24). Reakciu sme uskutočnili v 96 priehlbinkových planžetách. Pre stanovenie testu sme leukocyty priviedli do koncentrácie 2×10^6 buniek/ml pre neutrofilny, inkubovali v objeme 100 µl s 5 µM nitridom nátria pri 37 °C v priebehu 20 minút . Potom sme pridali rovnaký objem FSP s testovanými dávkami PO, oproti kontrole - FSP. Po 60 minútovej inkubácie s polyoxidoniom pri 37 °C sme bunky sedimentovali centrifugovaním pri 200g 1min. , erytrocyty odstránili lýzujúcim roztokom (200 µl na jednu jamku) 0,15 M chloridu amónia (Reachim) , leukocyty jedenkrát premyli a resuspendovali v 400 µl FSP pre analýzu na prietokovom cytometre. Kvalitatívnym kritériom fungovania systému sme využili klasický stimulátor fagocytov forbolmyristyl acetat (FMA, Sigma), ktorý sme pridávali v dávke 100 µl/ml, 30 minút pred ukončením inkubácie. Analýzu vzoriek sme vykonali na prietokovom cytometre. Ne fluoreskujúci DCF – DA vo vnútri bunky po hydrolýze diacetatovej skupiny sa oxiduje peroxidom vodíka. Hodnotili sme priemernú geometrickú intenzitu fluorescencie (Geo Mean) dichlorfluoresceína (DCF), vznikajúceho v procese tejto reakcie a žiariaceho v zelenej oblasti spektra..

Separácia mononukleárných buniek.

Z heparinizovanej krvi darcov sme separovali mononukleárne bunky (MNB) na gradiente ficoll-pague (Pharmacia, $\rho = 1,077$) podľa metodiky Boyum. MNB sme priviedli do koncentrácie 2×10^6 buniek/ml v úplnom kultúrnom prostredí [(RPMI-1640 s pridaním 10% inaktivovanej embryonálnej teľacej plazmy (Sigma), 2mM L - glutamínu (Inštitút polyomyelitíd a vírusových encefalitíd AMH Ruska) a 40 µg/ml gentamicínu (Pharmacia)].

Stimulácia buniek k tvorbe cytokínov.

Pri skúmaní spontánnej a indukovanej syntézy cytokínov v kultúrnom prostredí sme k mononukleárom pridávali polyoxidonium v koncentráciách 1, 10 a 100 µg/ml (ŠVÚ - Inštitút imunológie MZ RF , OOO Immafarma). Syntézu IL - 1 β sme indukovali lipopolysacharidom (LPS, Sigma) 10 µg/ml v priebehu 24 hodín, TNF - α -

fytohemaglutininom (PHA, Sigma) 5 µg/ml a LPS 10 ng/ml 48 hod., IL - 6 - LPS 100 ng/ml 48 hod., IFN - α - vírusom choroby Newcastle (VBN, NIIEM m. N.F. Gamaley) suboptimálnou dávkou 24 hod., IFN - γ - PHA 5 µg/ml 72 hod. Bunky sme inkubovali pri 37°C v atmosfére 5% CO₂. Kostimulačný efekt polyoxidonia pre mononukleáry sme skúmali pri ich spoločnom účinkovaní s aktivátormi.

Stanovenie cytokínov.

Tvorbu cytokínov sme stanovovali v supernatantoch bunkových kultúr s využitím pevnofazovej imunofluorescentnej analýzy, využívajúc komerčné testy - systémov firmy „ Proteinovij kontur „ (IL - 1β, TNF - α, IL - 6, INF - α) a „ Cytelisa „ (INF - γ).

Hodnotenie fagocytózy.

Pre skúmanie sme použili FITC - označený stafilocok (7). Reakciu sme uskutočnili v 96 jamkových planžetách s objemom 200 µl. 90 µl (2x10⁶ buniek/ml) leukocytárnej suspenzie sme inkubovali s polyoxidoniom (100, 250, 500 µg/ml), potom v jamku sme pridali 90 µl značeného St. aureus (2x10⁶ buniek/ml) v zodpovedajúcom pomere fagocyty/baktéria zodpovedali 1:5. Po 30 minútovej inkubácie pri 37 °C bunky, ktoré pohltili baktérie sa sedimentovali centrifugovaním po dobu 1 minúty pri 200g. Erytrocyty sme odstránili lýzujúcim roztokom. Leukocyty sme resuspendovali v 200 µl 2% roztoku paraformaldehydu a analyzovali na prietokovom cytometre. V danom prípade sme hodnotili percenta buniek medzi granulocytmi a monocytmi pozitívnych v zelenom spektre fluorescencie, zodpovedajúcim FITC - označeným baktériám.

Hodnotenie vnútrobunkového killinga baktérii.

Inkubovali sme 90 µl leukocytárnej suspenzie (2x10⁶ buniek/ml), 90 µl FITC - značeného stafilocoka (2x10⁶ buniek/ml) a 20 µl objemu darcovskej plazmy v priebehu 20 min. pri 37 °C. Z dôvodu odstránenia nenaviazaných baktérií sme leukocyty usádzali centrifugovaním pri 200g 1 min. a pri 4 °C, dvakrát premývali fosfátno soľným pufrom. Následne sme leukocyty resuspendovali v 200 µl FSP v zodpovedajúcej koncentrácii polyoxidonia (do kontrolnej jamky sme dali iba FSP) a inkubovali pri 37 °C ešte 60 min. Leukocyty sme usádzali a resuspendovali v 200 µl 0,2% roztoku saponina (Sigma) v 10mM uhličitan - dihydrouhlčitanovom pufri (pH-9,5). Oslobodené baktérie sme sedimentovali pri 1000g 10 min. a resuspendovali v 200 µl FSP s 2,5 µg/ml propionátu iodida (PI), (Sigma). Po 10 minútach sme próbu analyzovali pomocou prietokového cytometra. Hodnotili sme percenta dvojitého pozitívneho baktérii (FITC+PI+) medzi FITC - označených baktérii (FITC+) pomocou prietokového cytometra v programe „CellQuest“. Využívajúc histogram, zodpovedajúci svieteniu stafilocoka pre PI, sme získali percenta zabitých baktérii vo vzťahu k sumáru zabitých a živých .

Analýza inhibície.

Pre analýzu vplyvu PO na O₂-závisle a O₂-nezávisle mechanizmy baktericídности od času vlastného killinga, t.j. časovej inkubácie, bol použitý inhibítor: azid nátria 0,1% (Merck), ktorý sa viaže na sulfhydrylné skupiny enzýmov lipozomu. Potom bunky sme sedimentovali a premývali od inhibítora so FSP. Po opakovanej sedimentácii k leukocytom sme pridávali saponin a ďalej pokračovali v reakcii podľa vyššie opísanej metodiky.

Hodnotenie chemiluminescencie.

Chemiluminescenciu (CL) sme registrovali na prístroji „ 1251 Luminometer „ (LKB). Do umelohmotných skúmaviek sme dali 300 µl FSP so zodpovedajúcimi dávkami polyoxidonia (v kontrole - 300 µl FSP), 100 µl roztoku luminola alebo lucigenina (Sigma) 0,1 mg/ml a 100 µl bunkovej suspenzie (2×10^6 buniek/ml). Po určení pikovej hodnoty spontánnej CL sme pridali 10 µl zymozana 20 µg/ml (Sigma), opsonizovanej objemovej plazmy od 20 darcov (donorov) a registrovali sme ukazovatele stimulovanej CL (v mV/min), (15).

Výsledky a hodnotenie.

Pri skúmaní mechanizmu účinku akéhokoľvek preparátu pred výskumníkmi ako prvá daná úloha je určenie druhu buniek na ktoré predovšetkým účinkuje farmako-látka. Už skôr sa ukázalo, že terčovými bunkami polyoxidonia sú pohyblivé makrofágy tkaní, cirkulujúce fagocyty krvi a taktiež usadené fagocyty retikulo - endotelialných tkaní (12). My sme využili metódu prietokovej cytometrie, ktorá dovoľuje s obrovskou ľahkosťou z leukocytov periférnej krvi vizuálne odseparovať tri populácie buniek: neutrofilny, monocytov a lymfocytov a tiež sledovať stupeň viazania sa látok s týmito typmi buniek. Pri použití FITC - značeného polyoxidonia (F - PO) bolo preukázané, že imunomodulátor vzájomne pôsobí so všetkými leukocytmi, no s rozličným stupňom vzájomného spolupôsobenia. Takto , polyoxidonium predovšetkým sa viaže s monocytmi a neutrofilmi a v značne menšom stupni s lymfocytmi periférnej krvi. Pri tretej hodine inkubácie ako aj pri zväčšovaní koncentrácie F - PO od 100 do 2000 µg/ml stredná geometrická intenzita svietenia, odrážajúca stupeň vzájomného pôsobenie preparátu s bunkou, pre monocytov narastala jej hodnota od $141 \pm 26,4$ do $473,3 \pm 75,7$ zod. jed. ($p < 0,01$). Ukazovateľ pri neutrofilov bol nižší o 10 - 20% (od $109,1 \pm 21,3$ do $386,5 \pm 74,8$ zod. jed. zodpovedajúc; $p < 0,01$). Hladina svietenia preparátu pre lymfocytov bola nižšia v priemere o 7 - 8 krát v porovnaní s monocytmi a v 6 - 7 krát v porovnaní s neutrofilmi (od $16,4 \pm 2,5$ do $65,0 \pm 13,6$; $p < 0,05$). Vzájomné pôsobenie polyoxidonia s bunkami málo **dávka - závislý charakter** (obr.1). V priebehu troch hodín inkubácie sa pozorovalo narastanie svietenia F - PO pre všetky tri populácie leukocytov v sledovanom diapazone koncentrácií. K štvrtej a piatej hodine inkubácie sa parametre prakticky nemenili, čo možno konštatovať, že vzájomne pôsobenie polyoxidonia s bunkami nastáva v priebehu prvých hodín dosahujúc maximum okolo tretej hodiny.

Následne potom, ako sme sledovali vzájomné pôsobenie PO s leukocytmi periférnej krvi v závislosti od doby a času je nutné ešte ozrejmiť či imunomodulátor ostane na povrchu bunky mnohobodové intereagujúc s cytoplazmatickou membránou, alebo preniká v cytozol. Pre riešenie tejto úlohy sme využili metódu elektrónovej mikroskopie. Pomocou elektrónovej mikroskopie je možná detekcia bunkovej štruktúry alebo aj preparátu, ktorý je značený koloidným zlatom v bunkovom prostredí (23, 27, 37, 46).

Na začiatku sme uskutočnili porovnanie morfológie buniek periférnej krvi opracovaných PO (500µg/ml) s inaktivovanými bunkami na ultraštruktúrnej úrovni. Bolo objavené, že morfológia sledovaných leukocytov (lymfocytov, monocytov a neutrofilov) je charakteristická pre daný typ buniek a zodpovedá už predtým publikovaným v literatúre (24, 43). Nebol zaznamenaný akýkoľvek negatívny účinok polyoxidonia na ultraštruktúru buniek krvi človeka. Jednak ako v experimente tak aj v kontrole boli objavené jednotlivé prípady buniek s väčším perinukleárnym prostredím a hyperkondenzáciou chromatinu jadra, čo svedčí o apoptotických alebo nekrotických procesoch v nich prebiehajúcich.

Vykonal sme elektronomikroskopické skúmanie morfológie leukocytov periférnej krvi inkubovanej v priebehu 1 hod. s polyoxidoniom, ktorého molekuly sú naviazané v komplexe

s časticami koloidného zlata (Au - PO). Po pridaní PO do 0,01% roztoku HAuCl₄ (10nM) metódou spektrofotometrie vo viditeľnej oblasti (450λ<math><800\text{nm}</math>) bola dokázaná tvorba nových viac organizovaných štruktúr - komplexov PO s iónmi zlata. Môže to ešte raz poslúžiť ako dôkaz tohto faktu, že polyoxidonium predstavuje aj silného tvorca komplexov (10). Týmito istými metódami po uskutočnení dialýzy roztokov komplexu Au - PO rôzneho zloženia oproti vode a 0,2 M roztoku NaCl bola stanovená ich stabilita v týchto prostrediach.

Preukázalo sa, že Au - PO sa nachádza jednak na povrchu neutrofilov tak aj vo vnútri buniek (fagocytárna frakcia). V prípade neutrofilov a monocytov bol Au - PO komplex objavený v jemných jednomembránových vezikulách nachádzajúcich sa v cytoplazme (obr.2). Množstvo častíc zlata nachádzajúcich sa vo vezikule sa pohybovalo od 3 - 4 do 8 častíc. Častejšie sa však vezikuly so zlatom nachádzali blízko jadra čo s predpokladom môžeme hovoriť o transporte látky k nemu.

Podarilo sa nám tiež zachytiť moment pohlcovania reťazca častíc koloidného zlata neutrofilom z povrchu bunky, ktorý je zobrazený na obr.3. Možeme predpokladať, že do fagocytov sa polyoxidonium dostáva cestou pohltienia látky bunkou z povrchu vytvorením vezikuly t.j. endocytozom. Na povrchu lymfocytov častice koloidného zlata boli taktiež objavené, no neboli zachytené - zafixované ani v jednom prípade s ich vnútrobunkovou lokalizáciou. Môže to svedčiť o tom, že PO nepreniká do lymfocytov, alebo preniká, no v nevelkých množstvách.

Následne ako látka sa kontaktovala s bunkou prostredníctvom vzájomného pôsobenia s receptormi a/alebo prenikla v cytozol, naštartuje sa kaskáda aktivačných procesov vedúcich k funkčným zmenám: pohyb v smere druhej fázy bunkového cyklu, zvýšenie alebo zníženie aktivity sekrécie, prechod do apoptózy atď. Je známe, že proces aktivácie leukocytov pozostáva z dvoch etáp: prajmirovanie a štart. Na molekulárnej úrovni sa efekt prajmirovania určuje ako proces privádzajúci k aktivácii proteín kinázu - C (PKC) bez mobilizácie kalcia t.j. ako neplný signál. V ďalšom účinkovaní aktivačného agensa sa zakončuje vytváranie signálu cestou mobilizácie Ca²⁺ s účasťou inositoltrifosfátu (IP₃). Aktivácia sa môže uskutočniť aj na úkor súčasného uskutočnenia sa obidvoch vnútrobunkových procesov. Kalcium - dôležitá vnútrobunková prenosová molekula aj takých reakcií, ako je chemotaxis a degranulácia. Zvýšenie koncentrácie kalcia v cytozole predstavuje nevyhnutný a dostatočný stimul pre exocytózu, a možno, aj pre chemotaxis a fagocytózu, no ne pre respiračné vzplanutie pre ktoré hlavný prenosový mechanizmus predstavuje aktivácia PKC (3), t.j. existencia i kalcium nezávislej cesty aktivácie bunky. Takto PHA, ktorý predstavuje silný stimulátor respiračného vzplanutia vo fagocytoch sprostredkováva svoj signál prostredníctvom aktivácie PKC (42), ktorý spôsobuje otvorenie kalciovej pumpy a potom následne vypumpovanie Ca²⁺ z bunky (40,48).

Pri skúmaní vplyvu polyoxidonia na tvorbu vnútrobunkového kalcia pomocou prietokovej cytometrie bolo preukázané, že imunomodulátor nepodporuje aktiváciu mobilizácie Ca²⁺ z vnútrobunkových depozitov ale pasívnym tokom Ca²⁺ iónov do bunky (obr.4). Tak isto je chybný predpoklad o tom, že polyoxidonium môže aktivovať otvorenie kalciových kanálikov pre vstup dvojvalentného iónu.

Môžeme predpokladať, že polyoxidonium aktivuje bunku kalcium - nezávislou cestou prostredníctvom PKC alebo kalcium - závislou cestou ale po účinku prajmirujúceho agensa. Čo sa týka prvej verzie, to po aktivácii PKC mal by nastať mohutný výron aktívnych foriem kyslíka ako je to u respiračného vzplanutia. Avšak zo získaných hodnôt uvedených nižšie je známe, že H₂O₂ pod vplyvom polyoxidonia sa tvorí iba v nevelkých množstvách; dostatočných iba pre uskutočnenie aktivácie signálov. Skôr všetkého, účinok imunomodulátora je sprostredkovaný prostredníctvom prajmirujúceho agensa, ktorý naštartuje aktiváciu PKC a následne ďalším vplyvom imunomodulátora sa začína mobilizácia Ca²⁺.

Takže poznáme druhý mediátor aktivácie leukocytov - t.j. vnútrobunkový H_2O_2 . Pre identifikáciu aktívnych foriem kyslíka v bunke sme využili rôzne fluorochromy, ktoré sa aktivujú pri vzájomnom účinku s týmito radikálmi, bezprostredne v cytoplazme bunky. V našej práci sme použili DCF - DA ako induktor kvality vnútrobunkového H_2O_2 . DCF - DA spočiatku nemá fluorescenčné vlastnosti, pasívne difunduje do bunky, kde pod vplyvom vnútrobunkových esteráz sa uskutoční hydrolýza diacetátovej skupiny. V prítomnosti peroxidázy DCF sa oxiduje peroxidom vodíka, získavajúc tak fluorescenčnú vlastnosť (36). Pomocou prietokovej cytometrie môžeme hodnotiť intenzitu fluorescencie DCF a takto posúdiť intenzitu tvorby H_2O_2 v oddelene sledovanej bunke. Polyoxidonium zosilňoval intenzitu fluorescencie DCF (Geo Mean) po jednodinovej inkubácii vo všetkých leukocytoch aj lymfocytoch (obr.5). Treba poznamenať, že v porovnaní s PHA, klasickým aktivátorom kyslíkového vzplanutia, ktorý spôsobil až 10 - násobné zosilnenie fluorescencie, polyoxidonium demonštroval nie tak skutočné zvýšenie Geo Mean (obr.6). V dávke $500\mu\text{g/ml}$ preparát dal štatisticky dostatočné zvýšenie ukazovateľa Geo Mean pri neutrofiloch a monocytoch. Takže Geo Mean kontrolných neutrofilov sa rovnal $56,7 \pm 24,0$; v prítomnosti PO $77,5 \pm 33,5$ ($p < 0,05$), u monocytov to zodpovedalo $11,2 \pm 5,7$ a $14,2 \pm 5,3$ ($p < 0,05$). V priemere, svietenie neutrofilov i monocytov sa zvýšilo o 30 - 40%. Svietenie lymfocytov je nevýznamné, no i tak bolo zvýšené o 20%.

Rôzne práce v posledných rokoch poukazujú na to, že veľké zväčšenie hladiny H_2O_2 zohráva kľúčovú úlohu pre aktiváciu radu signálnych molekúl (33, 34, 44) a má tiež nemalý biologický význam ako fenomén „respiračné vzplanutie“. Bola dokázaná prítomnosť H_2O_2 v procese aktivácie dôležitého transkripčného faktora NF - kB (29, 31, 34). NF - kB reguluje transkripciu génov, produkty ktorých zodpovedajú za rozvoj zápalu i imunitnej odpovede, produkciu NO, replikáciu vírusov, medzibunkové vzájomné vzťahy, proliferáciu, apoptózu atď. (31). Je objasnené, že syntéza VEGF (vascular endothelial growth factor) makrofágálnej kultúry U 937 sa štartuje H_2O_2 (22). H_2O_2 je taktiež spolu účinkujú v aktivácii fosfolipázy C - $\gamma 1$ (PLC - $\gamma 1$). PLC - $\gamma 1$ hrá dôležitú rolu v regulácii bunkovej proliferácie i diferenciacie prostredníctvom indukcie druhotných messengerov - diacyl glycerola i inositol - 3 - fosfátu, vedúcich k aktivácii PKC a mobilizácie Ca^{2+} (44). Na kultúre pľúcnych ľudských fibroblastov (HLF) bolo preukázané, že stimulácia týchto buniek TGF - $\beta 1$ vedie tranzitornému zvýšeniu H_2O_2 , ktorý následne spôsobuje zvýšenie Ca^{2+} , s následnou aktiváciou MAPK (mitogén - activated protein kinase), AP - 1 a v konečnom dôsledku vedie k expresii génu IL - 6 (33).

Nami pozorované zvýšenie hladiny v H_2O_2 v neutrofiloch a monocytoch darcov počas jednodinovej inkubácie s polyoxidoniom pravdepodobne tiež poukazuje na schopnosť imunomodulátora vplývať na mechanizmus prenosu signálov v bunke, čo v skutočnosti vedie k aktivácii jadrového faktora NF - kB a tak následne k naštartovaniu tvorby cytokínov. Tento proces vysvetľujú nižšie popísané hodnoty indukované polyoxidoniom syntézy prozápalových cytokínov (IL - 1β , TNF - α a IL - 6) monocytmi periférnej krvi darcov.

Je známe, že výsledkom aktivácie bunky sa štartuje súbor procesov prevádzajúcich bunku na novú úroveň jej fungovania. Podľa tohto vzoru treba skúmať ako sa prejavuje imunostimulačný vplyv polyoxidonia na funkčnosť buniek periférnej krvi.

Všetky bunky imunitného systému sú východiskovým zdrojom biologicky aktívnych látok čo sa odráža v ich funkčných charakteristikách. Ako je známe, monocyty/ makrofágy, neutrofilý a lymfocyty produkujú endogénne imunomodulátory - cytokíny (5). Pomocou imunoenzymovej analýzy sa uskutočnil výskum vplyvu polyoxidonia na spontánnu i stimulovanú tvorbu prozápalových cytokínov interleukina 1β [IL - 1β , faktora nekrózy tumorov α (TNF - α), IL - 6 a interferónov α a γ (INF - α a IFN - γ)] v podmienkach in vitro.

Ukázalo sa, že polyoxidonium stimuluje tvorbu mononukleárnymi periférnej krvi IL - 1β (tab. 1). V dávke $100\mu\text{g/ml}$ tvorba cytokínu bola zvýšená v priemere 7 - krát. Nebola

dosiahnutá dostatočná hladina významu, nakoľko sa objavil veľký rozptyl v skupine po stimulácii PO. Kostimulačný efekt pri spoločnom použití s LPS sa dostatočne prejavil v dávkach 10 i 100 $\mu\text{g/ml}$ t.j. bol **objavený synergický vplyv polyoxidonia** s bakteriálnym preparátom.

Pri analýze tvorby TNF - α bol preskúmaný rozdiel v spontánnej tvorbe tohto cytokínu u rôznych darcov. V podstate boli vytvorené dve skupiny so zníženou alebo normálnou (od 0 do 200 pg/ml - I skupina) a zvýšenou (od 200 a vyššie - II skupina) východiskovou hladinou sekrécie cytokínu. Ukázalo sa, že polyoxidonium predstavuje seba ako istinný imunomodulačný preparát, znižuje zvýšenú a zvyšuje zníženú spontánnu tvorbu TNF - α . Takto účinkoval polyoxidonium na kultúru MNB. U I. - skupiny nastalo zosilnenie syntézy cytokínu od 2 - 10 krát ($p < 0,05$ v dávke 10 $\mu\text{g/ml}$). Poznávame, že uprostred 11 sledovaných darcov mononukleáry dvoch prejavili protistojný efekt na účinok PO nezodpovedajúci svojim skupinám. Tieto hodnoty môžu závisieť od podmienok rozdelenia na skupiny darcov i od individuálnych schopností darcov. Je známe, že účinok imunomodulátorov závisí od individuálnej citlivosti. Preukázala sa korelačná závislosť medzi nukleinátom nátria i skupinami krvi (4). Existuje predpoklad o tom, že individuálna citlivosť je kontrolovaná geneticky (8).

Zaujímavé údaje boli získané pri spoločnej stimulácii MNB s polyoxidoniom a aktivátormi (tab. 3). Pri jednodňovom inkubovaní buniek s PHA a polyoxidoniom sa pozorovala zvýšená syntéza TNF - α , obzvlášť jasne pri maximálnej dávke ($p < 0,05$). Je známe, že PHA je stimulátorom lymfocytov, ktoré taktiež môžu produkovať TNF- α (17). Nakoľko polyoxidonium aktivuje predovšetkým monocytov tak pravdepodobne tieto stimuly sa skladajú v spoločný efekt. Alebo, že tuhá účinkuje kaskádový mechanizmus: PO aktivuje monocytov, ktoré následne odovzdajú signál aktivácie lymfocytom, výsledkom toho je zvýšená všeobecná tvorba prozápalového cytokínu. Avšak pri spoločnej indukcii LPS i PO je zaznamenaná znížená stimulácia tvorby TNF - α 1,2 - 1,6 krát ($p < 0,05$), t.j. modulačný efekt preparátu. Treba pripomenúť, že pri indukcii syntézy IL - 1 β bol zaznamenaný stimulujúci efekt. Môžeme predpokladať, že k druhému dňu inkubácie sa produkcia tohto prozápalového cytokínu znižovala ako v prípade dvojdennej inkubácie pri stimulácii syntézy TNF - α .

Zosilnenie syntézy IL - 6 v 1,2 - 3 krát (tab.1) s $p < 0,05$ v dávke 100 $\mu\text{g/ml}$ sa pozorovalo pri pridaní PO v kultúru nestimulovaných MNB. Pri spoločnom účinku PO a LPS kostimulačný efekt nebol objavený, prejavilo sa iba bezvýznamné zníženie produkcie IL - 6, ktoré malo nedostatočný charakter. IL - 6, tak IL - 1 β i TNF - α patria k prozápalovým cytokínom. A taktiež IL-6 predstavuje aj regulátora účinku daných cytokínov, inhibujúc ich tvorbu, t.j. IL - 6 patrí i k protizápalovým cytokínom (35). Preto stimulácia syntézy IL-6 polyoxidoniom určuje jeho modulačnú vlastnosť.

Takto v účinkovaní polyoxidonia na tvorbu prozápalových a protizápalových cytokínov sa pozoroval aj jeho skutočný imunomodulačný charakter.

Polyoxidonium nemení spontánnu produkciu IFN- α i INF- γ . Poznávame však, že v norme sa interferony neprodukujú kultúrou nestimulovaných MNB. Treba zdôrazniť, že pre udržanie prirodzeného antivírusového stavu monocytov/makrofagov je nevyhnutná nízka hladina východzieho TNF- α , čo je taktiež nevyhnutné pre aktiváciu killinga tumorových buniek(19). Pri účinku na stimulované MNB po spriemerovaných hodnotách polyoxidonium neprejavil akéhokoľvek štatistický významného efektu na tvorbu IFN- α a IFN- γ . Jednak, účinok polyoxidonia v organizme za prítomnosti akejkolvek patológie imunitného systému sa môže odlišovať od účinku preparátu sledovaného na darcovských bunkách v podmienkach in vitro. Takto napríklad, pri liečení imunomodulátorom genitálnej formy herpes vírusovej infekcie s rezistentnosťou k protivírusovej terapii 6 mesiacov po skončení liečenia bola pozorovaná aktivácia interferónového reťazca, hoci od samotného počiatku protivírusová imunita bola znížená (16). Pri určovaní množstva IFN- γ obsahujúceho u T-buniek (CD3+) po

stimulácií forbolmyristyl acetatom (PMA) MNB periférnej krvi u chorých na tuberkulózu pľúc percentuálne obsahujúcich daný typ buniek bol dostatočne nízky v porovnaní s kontrolou ($13,0 \pm 7,7\%$ a $22,8 \pm 5,2$ resp.). Po liečbe polyoxidoniom, množstvo IFN- γ obsahujúcich T-buniek, stimulovaných PMA sa zvýšilo na hladinu obsahu ako pri normálnej hladine $19,0 \pm 6,5$. Takýmto spôsobom v organizme polyoxidoniom aktivuje bezprostredne monocyty/makrofágy i neutrofile a následne aktivuje i lymfocyty.

Jednou z hlavných vlastností fagocytov, terčových buniek polyoxidonia je ich schopnosť aktivovať pohltie v procese fagocytózy mikroby, prostredníctvom kyslík - závislých i kyslík - nezávislých mechanizmov baktericídnosti. Prvá etapa fagocytózy – je pohltie cudzorodej častice. Pohlcovacu aktivitu sme hodnotili pomocou prietokovej cytometrie, ktorá umožňuje presne diferencovať veličinu tohto ukazovateľa u mono - i polynukleárných fagocytov. Výskum ukázal, že polyoxidoniom nemení percenta fagocytózy mikrobiálnych agensov (*St. aureus*) ako u neutrofilov (kontrola $22,7 \pm 7,1\%$ a $24,0 \pm 7,2\%$ v dávke $500 \mu\text{g/ml}$) tak aj u monocytov ($51,6 \pm 9,9$ a $54,0 \pm 6,6$ resp.).

Druhým dôležitým kritériom funkčnej aktivity monocytov a neutrofilov je následná etapa fagocytózy – killing pohltých (zajatých) baktérií. Pod vplyvom polyoxidonia ukazovatele vnútrobunkovej baktericídnosti značne stúpali. Účinok polyoxidonia má dôza – závislý charakter ako je to ukázané v tab. 5. Polyoxidoniom zvyšuje percenta killinga baktérií v dávke $250 \mu\text{g/ml}$ v priemere o 44% a v dávke $500 \mu\text{g/ml}$ až na 75% .

Uskutočnili sme taktiež sledovanie baktericídnej aktivity fagocytov u chorých na chronickú granulematóznou chorobu (CGD) . Toto ochorenie je charakteristické vrodenným poškodením tvorby aktívnych foriem kyslíka spôsobené genetickým defektom leukocytárnej NADPH-oxidázy. Zistilo sa, že polyoxidoniom zvyšuje efektívnosť killinga u chorých na CGD s počiatočnej veľmi nízkej hladiny baktericídnosti $12,5 \pm 4,2\%$. V dávke $500 \mu\text{g/ml}$ polyoxidoniom obnovuje hodnoty k hladine baktericídnosti zdravých darcov $36,8 \pm 5,2$; $p < 0,01$ (tab.4). Na histograme (obr.7) získaného pri cytometrii vzoriek chorého CGD je vidieť , že percenta pozitívnych po propidium iodida baktérií (zabité baktérie) predstavuje celkom 9% a významne zvyšuje sa pod vplyvom polyoxidonia (24%).

Cieľom ozrejmenia stimulačného účinku PO na vnútrobunkový killing *Staphylococca aureus* sme uskutočnili inhibičnú analýzu. Pre tento cieľ sme použili inhibítory – azid nátria (blokádna enzýmov dýchateľného reťazca) a metyl maleimida (viaže sa so sulfhydrylnými skupinami enzýmov lipozomu), blokujúci odpovedajúce O_2 – závislé a O_2 – nezávislé mechanizmy baktericídnosti. U darcov oba inhibítory znížili percentá baktericídnosti zlatého stafilocoka stimulovaných PO. Pritom ukazovatele killinga sa priblížili k východzej hladine (s PHA bez PO), ako je vidieť z tab.5. Avšak u chorých na CGD polyoxidoniom aj tak zvýšil percentá killinga baktérií pri ľubovolnom variante inhibície (azid nátria, metyl maleimid, azid nátria + metyl maleimid). Takýmto spôsobom stimulácia baktérií u chorých na CGD je nepravdepodobne spojená s O_2 – závislými mechanizmami (pretože genetický defekt NADPH – oxidázy to vylučuje), (32, 47), sprostredkováva sa cez O_2 nezávislé mechanizmy neblokované metyl maleimidom. Predpokladáme, že stimulácia vnútrobunkového killinga stafilocoka je spojená s aktivovaním NO – závislej cesty hynutia baktérií. NO – má veľký význam pre killing *Micobacterium tuberculosis*, *Plasmodium falciparum* a iné patogénne mikroorganizmy (21, 30, 39). Expresia enzýmu iNOS (indukovaná forma NO-syntetázy) zodpovedného za syntézu NO vo fagocytoch čiastočne v makrofágach, monocytoch a neutrofiloch, indukuje sa lipopolysacharidom, prozápalovými cytokínmi, tumorovými bunkami (21, 26, 30, 39, 41, 45).

Baktericídnosť fagocytov je určovaná lokálnou kyslosťou, aktivitou lyzozómalných enzýmov, kationových bielkovín, produktami dusíkového metabolizmu a taktiež tvorbou aktívnych foriem kyslíka počas respiračného vzplanutia. Posledné faktory priniesli obrovský vklad do všeobecného procesu killinga patogénnych mikroorganizmov čo môžeme usúdiť

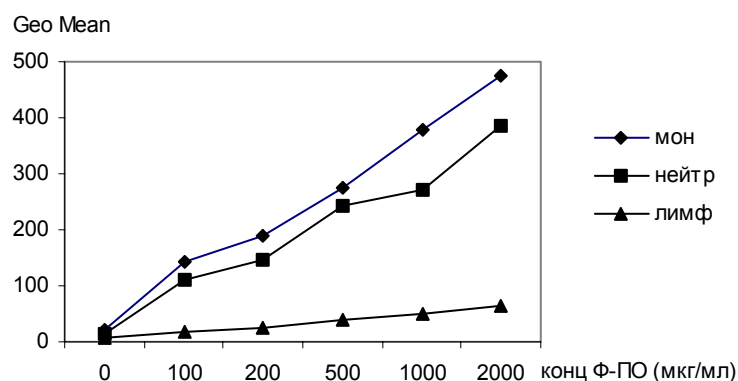
napr. z rozvoja chronickej granulomatóznej choroby (CGD). Určenie produkcie aktívnych metabolitov kyslíka má nielen diagnostický význam ale dáva tiež možnosť posúdiť stupeň prebudenia bunky a jej funkčný potenciál pri účinku vonkajšieho stimulu. Sledovanie hladiny tvorby aktívnych foriem kyslíka dovoľujú metódy registrácie luminol- a lucigenin – závislej chemiluminescencie buniek a taktiež vyššie opísaná detekcia intenzity svietenia dichlorfluoresceína DCF v neutrofiloch a monocytoch pomocou prietokovej cytometrie.

Pri skúmaní CL indukovanej polyoxidoniom boli získané výsledky protichodné k DCF – testu, určujúceho vnútrobunkový H_2O_2 . Vplyv polyoxidonia na luminol a lucigen – závislej CL fagocytov periférnej krvi je sumarizovaná v tab.6. Tvorba bunkami na vonkajšej membráne metabolitov kyslíka sa neregistruje pomocou luminofórov (luminol uvoľňuje kvantum svetla v dôsledku reakcie s peroxidom vodíka, lucigenin sa oxiduje a luminiscuje v dôsledku reakcie s superoxidovým aniónom) v prítomnosti polyoxidonia sa významne znižuje. Štatisticky významné zníženie chemiluminiscenčného signálu ako spontánneho tak aj stimulovaného opsonizovaným zymozanom sa pozorovalo u všetkých testovaných dávok polyoxidonia.

Zníženie chemiluminiscenčného signálu vplyvom účinku polyoxidonia môže byť dôkazom buď o schopnosti preparátu nepriamo potláčať leukocytárnu NADPH-oxidázu alebo o silnej antioxidantnej vlastnosti imunomodulátora. Nemožnosť prvého mechanizmu môžeme usúdiť na základe metodiky hodnotenia CL, ktorá naštartovala predbežnú etapu stimulácie buniek polyoxidoniom. Sotva je možné okamžite inhibovať úplne taký enzýmový komplex akým je NADPH-oxidáza. Za ďalšie by to mohlo viesť k zníženiu vnútrobunkového killinga stafilokoka. Analýza stupňa zníženia chemiluminiscenčného signálu jednoduchej vzorkou ako aj stimulovaného zymozanom ukázala, že význam CL v prítomnosti určitej dávky polyoxidonia znižuje sa proporcionálne pre obe vzorky (obr.8). Takýmto spôsobom **antioxidačná „kapacita“ polyoxidonia závisí od jeho koncentrácie.**

Obr. 1 Závislosť dóza – efekt intenzity svietenia (Geo Mean) F-PO (100 – 2000 $\mu\text{g/ml}$) na leukocytoch (3 hod. inkubácie).

—•— monocyty, —■— neutrofily, —▲— lymfocyty

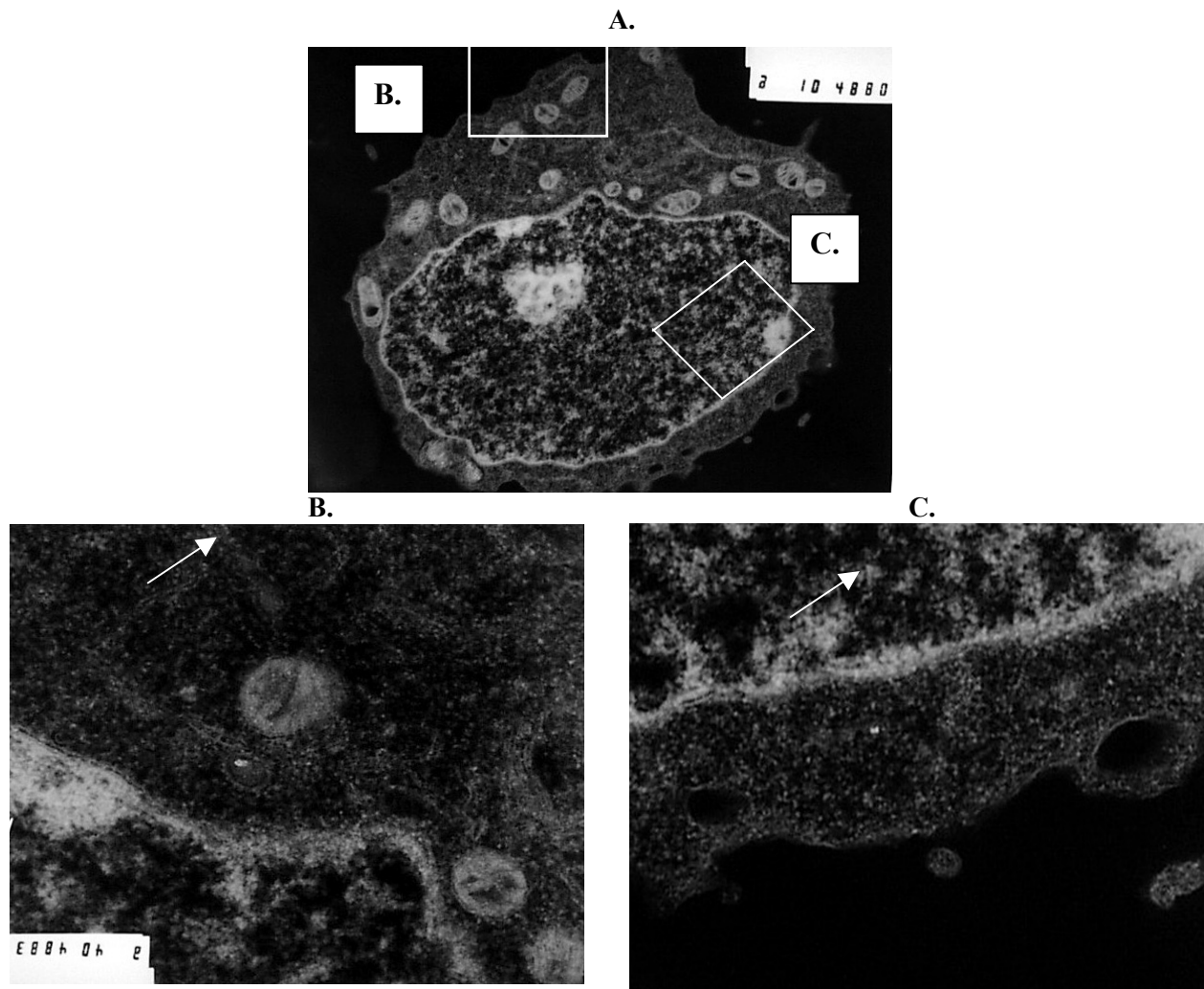


koncentrácia F-PO ($\mu\text{g/ml}$)

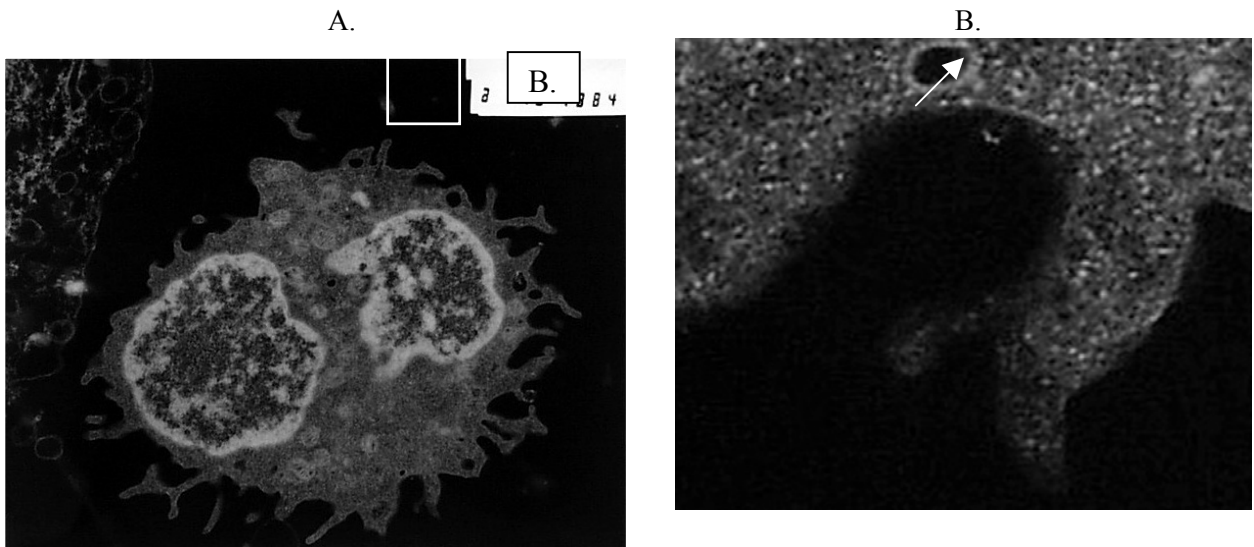
Obr. 2 Vezikula s Au – PO v monocytu. Elektronové mikrofotografie.

A– fagocyt s vezikulou obsahující PO (200µg/ml), značeného koloidním zlatem.

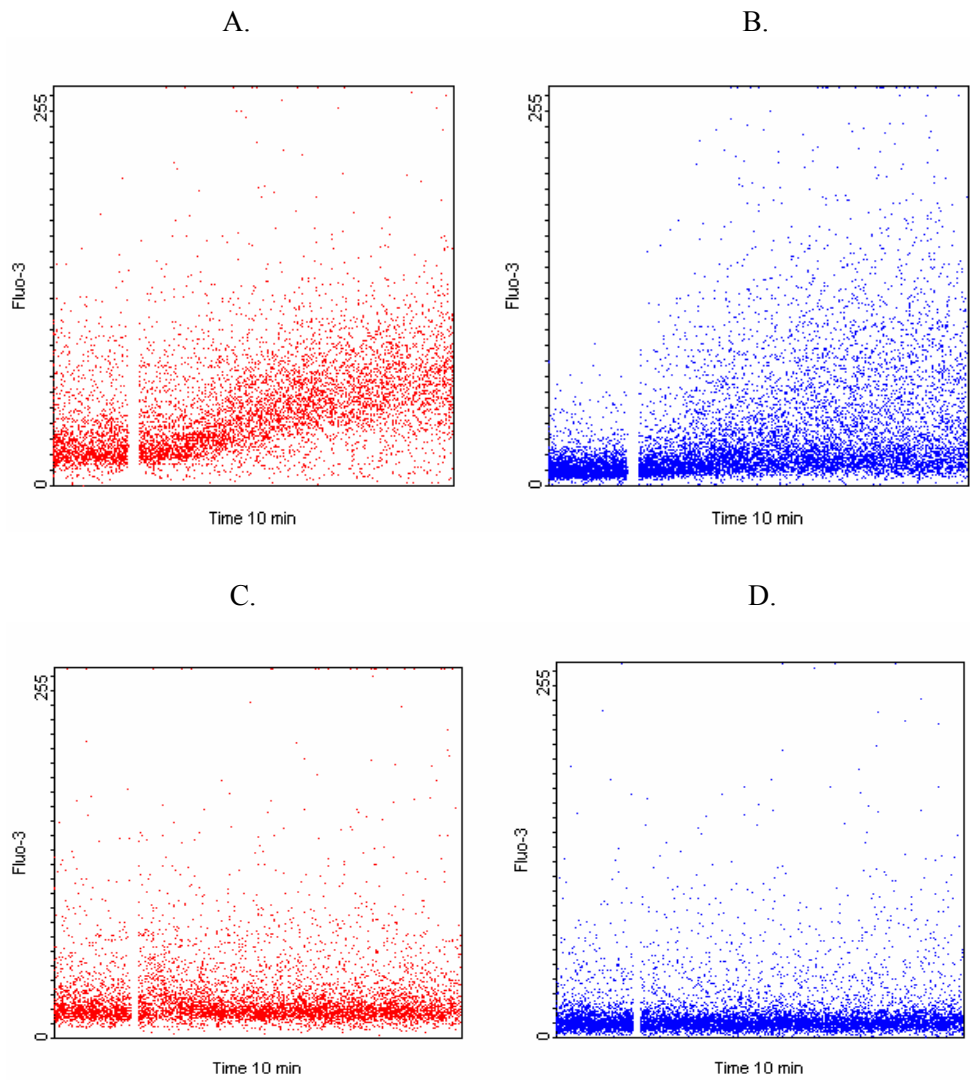
B – zvětšená elektronová mikro -fotografia monocytu (A): vezikula je označena šípkou.



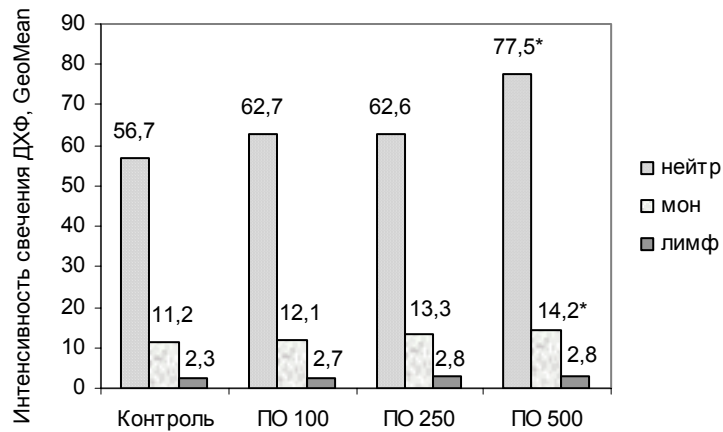
Obr. 3. Zachytenie komplexu Au-PO fagocytom periférnej krvi. Elektronové mikrofotografie. B – zväčšenina neutrofilu (A): šipkou je označená častica koloidného zlata.



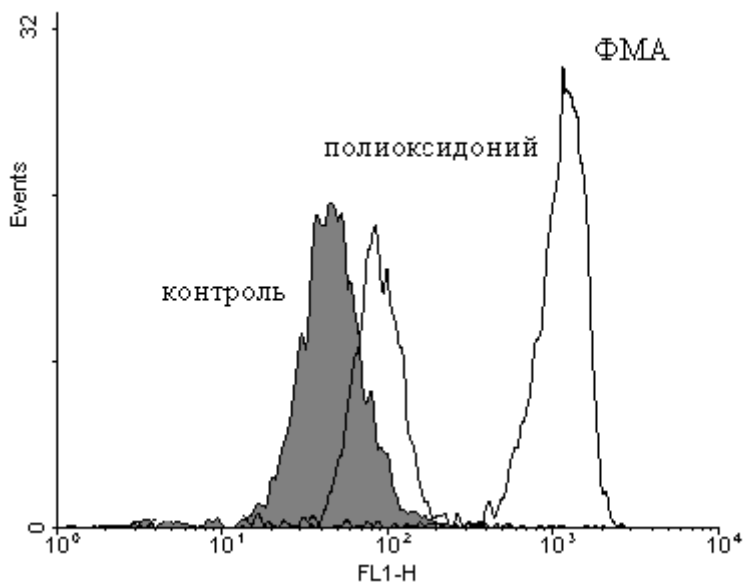
Obr. 4. Detekcia vnútrobunkového Ca^{2+} pomocou farbičky Fluo-3 pod vplyvom Ca^{2+} -iónofora A23187 v koncentrácii $1\mu\text{g/ml}$ (A. – neutrofilly, B. – lymfocyty) a polyoxidonia - $200\mu\text{g/ml}$ (C. – neutrofilly, D. – lymfocyty) v priebehu 10 min.



**Оbr. 5. Vplyv polyoxidonia (100, 250 a 500 $\mu\text{g/ml}$) na hladinu syntézy peroxidu vodíka, hodnotenej na základe fluorescencie DCF (Geo Mean),(n=15).
*-p<0,05 v porovnaní s kontrolou (bez polyoxidonia).**



Оbr. 6. Cytofluorogram DCF – testa. Vplyv polyoxidonia (500 $\mu\text{g/ml}$) na hladinu vnútrobnového H_2O_2 v neutrofiloch periférnej krvi donorov. FMA v dávke 100 ng/ml.



Tab. 1. Stimulačný a kostimulačný efekt polyoxidonia na syntézu IL - 1 β a IL - 6 (pg/ml, M \pm m) mononukleárnymi bunkami. (LPS 100mg/ml - pri indukcii IL-6, LPS 10 μ g/ml - pre indukciu IL - 1 β).

Cytokín	PO 0 μ g/ml		PO 1 μ g/ml		PO 10 μ g/ml		PO 100 μ g/ml	
	Bez LPS	LPS	Bez LPS	LPS	Bez LPS	LPS	Bez LPS	LPS
IL- 1B (n = 4)	56 \pm 37	143 \pm 23	93 \pm 54	91 \pm 44	175 \pm 150	256 \pm 81*	387 \pm 270	280 \pm 96*
IL - 6 (n = 7)	131 \pm 71	1124 \pm 496	161 \pm 68	1083 \pm 762	190 \pm 113	1087 \pm 514	259 \pm 155*	1108 \pm 398

Tab. 2. Účinok polyoxidonia na syntézu TNF - α (pg/ml, M \pm m) neindukovanými mononukleárnymi donorov s východzu strednou (I skupina) a zvýšenou (II skupina) úrovňou produkcie cytokínu.

TNF - α	PO 0 μ g/ml	PO 1 μ g/ml	PO 10 μ g/ml	PO 100 μ g/ml
I. skup. (n = 5)	87 \pm 36	324 \pm 179	356 \pm 304	388 \pm 240*
II.skup. (n = 4)	525 \pm 144	341 \pm 98	425 \pm 104*	465 \pm 187

*-p<0,05 v porovnaní s kontrolou

Tab. 3. Kostimulačný efekt polyoxidonia na syntézu THF - α (pg/ml, M \pm m), indukovaného FGA (5 μ g/ml) a LPS (100 ng/ml).

Induktor	PO 0 μ g/ml	PO 1 μ g/ml	PO 10 μ g/ml	PO 100 μ g/ml
FGA (n = 5)	926 \pm 422	898 \pm 271	936 \pm 348	1424 \pm 637*
LPS (n = 5)	725 \pm 174	647 \pm 216*	597 \pm 197*	572 \pm 146*

*-p<0,05 v porovnaní s kontrolou

Tab. 4. Vplyv Polyoxidonia (μ g/ml) na baktericídnu aktivitu fagocytov periférnej krvi (% , M \pm m).

	Kontrola	Polyoxidonium		
		100	250	500
Donori (n=11)	33,9 \pm 7,3	34,5 \pm 8,8	48,7 \pm 10,2**	59,3 \pm 6,8**
Pacient CGD (n=5)	12,5 \pm 4,2	15,6 \pm 3,6	22,0 \pm 2,4**	36,8 \pm 5,2**

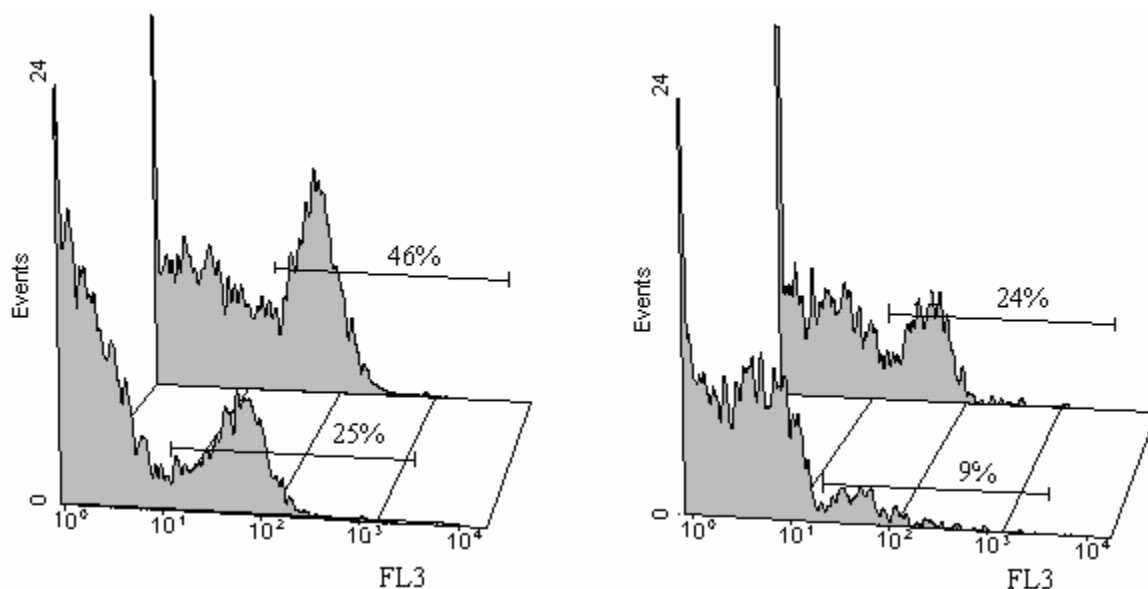
**-p<0,01 v porovnaní s kontrolou

Tab. 5. Vplyv inhibítorov na vnútrobunkový killing stafilokoka (% , $M \pm m$) u darcov i chorých na CGD bez a v prítomnosti 500 $\mu\text{g/ml}$ polyoxidonia. Inhibítory: azid nátria – 0,1%, metyl maleimid (M - mal.) - 1 mM.

	Bez polyoxidonia				V prítomnosti polyoxidonia			
	FP	Azid Na	M - mal	Azid Na +M-mal	FP	Azid Na	M - mal	Azid Na +M-mal
Donor (n=5)	33,0 \pm 6,0	20,1 \pm 2,7**	19,0 \pm 6,2	16,7 \pm 5,0**	56,8 \pm 13,3	37,2 \pm 7,2	40,0 \pm 14,1	35,0 \pm 9,9*
CGD (n=4)	13,8 \pm 3,6	15,5 \pm 5,2	12,4 \pm 2,9	10,5 \pm 2,2	38,5 \pm 4,1	30,8 \pm 3,4	35,0 \pm 3,5	37,7 \pm 7,4

*- $p < 0,05$ **- $p < 0,01$ v porovnaní s kontrolou (FSP)

Obr. 7. Cytofluorogramy baktericídnej aktivity fagocytov darcov (A) a chorého na CGD. Na prvom zobrazení sú kontrolné údaje (bez polyoxidonia), na druhom zobrazení - s polyoxidoniom 250 $\mu\text{g/ml}$. Na osi x - intenzita svietenia FITC - značeného St. aureus po PI, na osi y - množstvo baktérií.

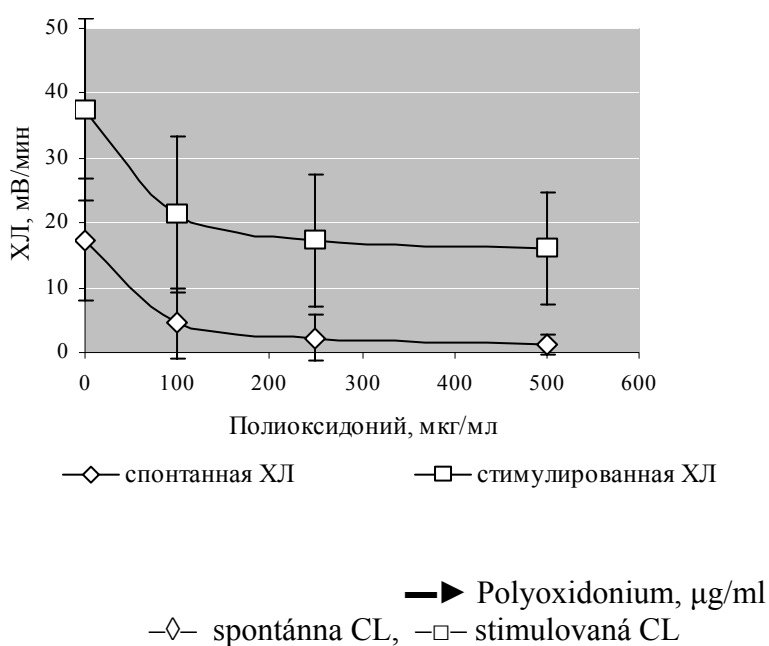


Tab. 6. Vplyv polyoxidonia ($\mu\text{g/ml}$) na úroveň chemiluminiscencie (mV/min.) fagocytov periférnej krvi donorov ($n = 8$).

	Kontrola (FP)	Polyoxidonium		
		100	250	500
Luminol - závislá chemiluminiscencia				
Spont.	$9,1 \pm 5,9$	$5,0 \pm 3,5$ *	$2,7 \pm 2,4$ **	$1,5 \pm 1,0$ **
Stimul.	$152,2 \pm 57,9$	$143,9 \pm 48,7$	$130,7 \pm 43,4$ *	$109,2 \pm 30,1$ **
Lucigenin - závislá chemiluminiscencia				
Spont.	$17,4 \pm 9,4$	$4,5 \pm 5,5$ **	$2,3 \pm 3,6$ **	$1,2 \pm 1,5$ **
Stimul.	$37,4 \pm 14,0$	$21,3 \pm 11,9$ *	$17,4 \pm 10,2$ **	$16,0 \pm 8,7$ **

*- $p < 0,05$ **- $p < 0,01$ v porovnaní s kontrolou (FP)

Obr. 8. Zníženie spontánnej a stimulovanej lucigenin – závislej chemiluminiscenčného signálu leukocytov donorov pod vplyvom rôznych dávok polyoxidonia ($n = 8$).



Záver.

- 1., Pri skúmaní viazania sa značného F-PO s bunkami periférnej krvi bolo preukázané, že preparát najintenzívnejšie spolupôsobí s monocytami, trochu slabšie s neutrofilmi a v 7-8 ráz slabšie v porovnaní s monocytami – s lymfocytami.
- 2., Nizkomolekulárna frakcia F-PO je schopná preniknúť jednak do buniek fagocytárneho

rádu , tak aj v lymfocyty , hoci s menšou efektivitou.

- 3., Polyoxidonium, značeny koloidným zlatom , preniká do fagocytov endocytózom.
- 4., Aktivácia leukocytov pod účinkom polyoxidonia nie je sprevádzaná výstupom Ca^{2+} z vnutrobunkových depo, avšak zvyšuje sa tvorbou vnútrubunkového H_2O_2 – druhého markera aktivácie.
- 5., Polyoxidonium stimuluje syntézu prozápalových cytokínov IL-1 β a IL-6 a vykazuje modulárny efekt na tvorbu TNF- α v podmienkách in vitro.
- 6., Tvorbu interferónov IFN- α a IFN- γ v podmienkach in vitro polyoxidonium ne stimuluje.
- 7., Pod vplyvom polyoxidonia sa preukázala závislosť od množstva baktericídna aktivita fagocytov .
- 8., Polyoxidonium významne znižuje tvorbu aktívnych foriem kyslíka v prostredí, potvrdzujúc tak svoju antioxidačnú vlastnosť.

Literatúra:

- 1., Averkiev V.L., Tarasenko V.S., Latyševa T.V., Averkieva L.V.,
Korekcia imunologických poškodení u pacientov s pankreonekrozom.
Immunologia. 2002 No.6 str. 356-359
- 2., Arššinoва S.S., Pinegin B.V., Stachanov V.A., Simonova A.V., Mazurov D.V., Golubeva N.M., Perevezenceva E.O.,
Imunomodulátor polyoxidonium v komplexnej terapii chorých na tuberkulózu pľúc.
Immunologia. 2001. No.3 str. ,35-40
- 3., Dejl M.M., Formena Dž. K.
Sprievodca po imunofarmakológii. Moskva 1998 str. 39
- 4., Zemskov A.M., Zemskov V.M., Karaulov A.B., i d'al.
Imunitná reaktivita a genetické markre krvi. Moskva 1999
- 5., Ketlinskij S.A., Simbircev A.S., Vorobyev A.A.,
Endogénne imunomodulátory .
Hippokrat 1992
- 6., Luss L.V., Nekrasov A.V., Puchkova N.G., Bchardvarž A., Bchardvarž L.A.,
Úloha imunomodulátornej terapie vo všeobecnej praktike kliniky.
Immunologia. 2000. No.5 str. 34-39
- 7., Mazurov D.V., Dambaeva S.V., Pinegin N.G.,
Hodnotenie vnútrubunkového killinga stafilokoka fagocytami periférnej krvi s pomocou prietokovej cytometrie.
Immunologia. 2000. No.2 str. 57-59
- 8., Maňko V.M., Petrov R.V., Chaitov R.M.,
Imunológia: história, smery rozvoja, súčasný stav a perspektívy.
Immunologia. 2002. No.3 str. 132-138
- 9., Nekrasov A.V., Puchkova N.G., Ivanova A.S., i d'al.

Odvođeniny od poly - 1,4 – etylenpiperazina, majúce imunomodulačné, protivírusné a antibakterialne aktivity.

Pat. RF No. 2073031, 1997

- 10., Petrov R.V., Kabanov V.A., Chaitov R.V., Nekrasov A.V., Ataulachanov R.I.
Konjugované polymérno – subdinálne imunogény a vakciny.
Immunologia. 2002. No.6 str. 324-329
- 11., Petrov R.V., Chaitov R.M., Nekrasov A.V., i d'al.
Polyoxidonium – imunomodulátor poslednej generácie: postrehy z trojročného používania.
Alerg. ast. a klin. imunol. 1999 No.3 str. 3-6
- 12., Pinegin B.V., Sarach A.S.,
Domáci imunomodulátor „ Polyoxidonium „ ; mechanizmus účinku a klinické použitie. ŠVÚ – Inštitút imunológie MZ RF, OOO Immafarma, 2000.
- 13., Romanova A.V., Latyševa T.V.,
Použitie polyoxidonia v komplexnej terapii u pacientov s ťažkou formou bronchiálnej astmy . Immunologia. 2002. No.6 str. 372-376
- 14., Chaitov R.M., Pinegin B.V.,
Súčasnú imunomodulátory: základné princípy ich použitia.
Immunologia. 2000. No.5 str. 4-8
- 15., Chaitov R.M., Pinegin B.V., Istamov Ch. I.
Ekologická imunológia. Moskva vyd. VNIRO, 1995
- 16., Šulženko A.E.,
Imunomodulátor Polyoxidonium – nové smerovanie v liečbe HSV – 2 infekcie pri jej rezistentencie k acyklickým nukleotidom.
Immunologia. 2000. No5 str. 24-29
- 17., Jarilin A.A.,
Základy imunológie. Moskva, Medicina 1999
- 18., Bass D.A., Parce J. W., Dechatelet L.R., Szejda P., Seeds M.C., Thomas M.
Flow cytometric studies of oxidative product formation by neutrophils: a graded response to membrane stimulation.
J.Immunol. 1983. V.130. –N4. p.1910-1917
- 19., Beraldeli F.,
Role of interferons and other cytokines in regulations of the immune response.
APMIS. 1995 Vol.103., No.3 p.161-179
- 20., Burchiel S.W., Edwards B.S., Kuckuck F.W., Lauer F.T., Prossnitz E.R., Ransom J.T., Sclar L.A.,
Analysis of free intracellular calcium by flow cytometry: multiparameter and pharmacological applications.
Methods. 2000. No,21 p.221-230
- 21., Chiwakava C.B., Hemmer C.J., Dietrich M.
High levels of inducible nitric oxide synthetase mRNA are associated with increased monocyte counts in blood and have a beneficial role in plasmodium falciparum malaria.
Infectio and Immunity. 2000. V.68 N.1 p.394-399
- 22., Choo M., Hunt T., Hussain M.
Hydrogen peroxide stimulates macrophage vascular endothelial growth factor release.
Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol. 2001. V.280 p.H2357-H2363
- 23., Cornellisen M., Phillipe L, De Sitter S, De Ridder L.
Annexin V expression in apoptotic peripheral blood lymphocytes: an electron microscopic evaluation.
Apoptosis. 2002. V7 No.1 p.41-47

- 24., Eeden S.F., Klut M.E., Walker B.A.M., Hogg J.C.
The use of flow cytometry to measure neutrophil function.
J. of Immun. Meth. 1999 V.232 p.23-43
- 25., Erlandsen S.L., Magney J.E.
Color atlas of histology. USA, Mosby-Year Book, 1999
- 26., Evans T.J., Buttery L.D.K., Carpenter A., Springall D.R., Polak J. M., Cohen J.
Cytokine – treated human neutrophils contain inducible nitric oxide synthetase
that produces nitration of ingested bacteria.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1996. V.93 p.9553-9558
- 27., Falleni A, Trincavelli M.L, Macchia M, Salvetti F, Hamdan M, Calvani F, Gremigni V,
Lucacchini A, Martini C.
A(1) adenosine receptors in humans neutrophils: direct binding and electron microscope
visualization. J Cell Biochem. 1999 V.75 No.2 p.235-244
- 28., Goding J.W.,
Conjugation of antibodies with fluorochromes: modification to the standard methods.
J Immunol Methods. 1976 V.13 No.3-4 p.215-226
- 29., Hensley K., Robinson K.A., Gabbita S.P., Salsman S., Floyd R.A.,
Reactive oxygen species, cell signaling, and cell injury.
Free Radical Biology and Medicine. 2000. V.28 N.10 p.1456-1462
- 30., Jagannath C., Actor J.L., Hunter R.L.,
Induction of nitric oxide in human monocytes and monocyte cell lines by Mycobacterium
tuberculosis // Nitric Oxide: Biology and Chemistry. 1998 V.2 N.3 p.174-186
- 31., Janssen-Heininger Y.M., Poynter M.E., Baeuerle P.A.
Recent advances towards understanding redox mechanismus in the activation of nuclear
factor kB.
Free Radical Biology ang Medicine. 2000. V.28 N.9 p.1317-1327
- 32., Johnston R.B.
Clinical aspects of chronic granulomatous disease.
Curr Opin Hematol. 2001. V.8 N.1 p.17-22
- 33., Junn E., Lee K., Ju h., Han S., Im J., Kang H., Lee T., Bae Y., Ha K., Lee Z., Rhee S.,
Choi. Requirement of hydrogen peroxide generation in TGF-β1 signal transduction in
human lung fibroblast cells: involvement of hydrogen peroxide and Ca²⁺ in TGF-β1
– induced IL-6 expression.
J. of Immunol. 2000. V.165 p.2190-2197
- 34., Kamata H., Manabe T., Oka S., Kamata K., Hirata H.
Hydrogen peroxide activates/kappaB kinases through phosphorylation of serine residues
in the activation loops.
FEBS Lett. 2002. V.519(1-3). P.231-237
- 35., Kelso A.
Cytokines: principles and prospects.
Immunol. Cell Biol. 1998. Vol.76 p.300-317
- 36., Model M.A., Kuruga M.A. et al.
A sensitive flow cytometric method for measuring the oxidative burst.
J. of immunol. Meth. – 1997. – Vol.202. – P.105 – 111.
37. Montaner LJ, de Silva RP, Sun J, Sutterwala S, Hollinshead M, Vaux D, Gordon S. Type
1 and type 2 cytokine regulation of macrophage endocytosis: differential activation by IL –
4/IL – 13 as opposed to IFN – gamma or IL – 10. // J Immunol. – 1999. – V.162. – No.8. –
P.4606 – 13.
38. Ormerod M.G. Flow cytometry. – Oxford. – University press, 2000.
39. Rich E.A., Torres M., Sada E., Finegal C.K., Hamilton B.D., Toossi Z. Mycobacterium

tuberculosis (MTB) – stimulated production of nitric oxide by human alveolar macrophages

and relationship of nitric oxide production to growth inhibition of MTB. // *Tuber Lung Dis.* – 1997. – V.78. – N.5 – 6. – P.247 – 255.

40. Schondorf M, Bidlingmaier F, von Ruecker AA. Protein kinase C regulates IL – 8 and fMLP induced cytoplasmatic Ca²⁺ increase in human granulocytes by receptor modulation measurements by flow cytometry. // *Biochem Biophys Res Commun.* – 1993. – V.197.
41. Siedlar M., Mytar B., Krzeszowiak A., Baran J., Hyszko J., Ruggiero I., Wieckiewicz J., Stachura J., Zembala M. Demonstration of iNOS – mRNA and iNOS in human monocytes stimulated with cancer cells in vitro // *J Leukoc Biol.* – 1999. – V.65.
42. Spangoli A, Spadoni GL, Sesti G, Del Principe D, Germani D, Boscherini B. Effect of insulin on hydrogen peroxide production by human polymorphonuclear leukocytes. Studies with monoclonal anti – insulin receptor antibodies, and an agonist and an inhibitor of protein kinase C. // *Horm Res.* – 1995. – V.43. – No6. – P.286 – 93.
43. Stevens A, Lowe J. *Histology.* – England, Mosby – Year Book Europe, 1993.
44. Wang X. – T., McCullough K., Wang X. – J., Carpenter G., Holbrook N. Oxidative stress – included phospholipase C – γ 1 activation enhances cell survival // *J. of Biol. Chem.* – V.276. – N.30. – P.28364 – 28371.
45. Weinberg J.B., Misukonis M.A., Shami P.j., Mason S.N., Sauls D.L., Dittman W.A., Wood E.R., Smith G.K., McDonald B., Bachus K.E., Haney A.F., Granger D.L. Human mononuclear phagocyte inducible nitric oxide synthase (iNOS): analysis on iNOS mRNA, macrophages. // *Blood* – 1995 – V.86. – N.3. – P.1184 – 1195.
46. Yang DH, Tsuyama S, Ohmori J, Murata F. Sulfated glycosaminoglycans in guinea pig neutrophils studies by use cationic colloidal gold. // *J Histochem Cytochem.* – 1999. – V.47. – No7. – P.881 – 8.
47. Zeman K., Banasik M., Scopczynska H., Pokoca L., Bernatowska E. Contemporary diagnostic of chronic granulomatous disease. // *Centr Eur J Immunol.* – 2000. – V.25. – N3. – P.113 – 118.
48. Zhang J, Kaupke CJ, Zousefi S, Cesario TC, Vaziri ND. Flow cytometric investigation of neutrophil activation pathways by n – formyl – Met – Leu – Phe and phorbol myristate acetate. // *Biol Cell.* – 1995. V84. – No3. – P.147 – 53.

