

**КИЇВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
імені ТАРАСА ШЕВЧЕНКА**

ЛИЧ ІННА ВАЛЕНТИНІВНА

УДК: 612.017.1+615.281.8+612.015.348

**ІМУНОМОДУЛЯТОРНІ ВЛАСТИВОСТІ МОЛЕКУЛЯРНОГО
КОМПЛЕКСУ ДРІЖДЖОВА РНК – ТИЛОРОН**

03.00.09 – імунологія

Автореферат
дисертації на здобуття наукового ступеня
кандидата біологічних наук

Київ – 2008

Дисертацією є рукопис.

Роботу виконано на кафедрі біотехнології мікробного синтезу Національного університету харчових технологій Міністерства освіти і науки України

Науковий керівник: доктор біологічних наук, професор
кафедри біотехнології мікробного синтезу
Карпов Олександр Вікторович,
Національний університет харчових технологій
Міністерства освіти і науки України

Офіційні опоненти: доктор біологічних наук, старший науковий співробітник
інституту проблем патології Національного медичного
університету ім. О.О.Богомольця
Бичкова Ніна Григорівна,
головний науковий співробітник лабораторії імунології;

доктор медичних наук, професор
Мельников Олег Феодосійович,
завідувач лабораторією патофізіології та імунології
Інституту отоларингології
імені проф. О.С. Коломійченка АМН України.

Захист дисертації відбудеться “25” листопада 2008 р., о 14 годині на засіданні спеціалізованої вченої ради Д 26.001.14 Київського національного університету імені Тараса Шевченка за адресою: м. Київ, просп. акад. Глушкова, 2/12; біологічний факультет, ауд. 434.

Поштова адреса: 01033, м. Київ, вул. Володимирська, 64, біологічний факультет; т. 521-35-02.

З дисертацією можна ознайомитись у бібліотеці імені М. Максимовича Київського національного університету імені Тараса Шевченка (01033, м. Київ, вул. Володимирська, 58).

Автореферат розісланий “ ___ ” жовтня 2008 р.

Вчений секретар
спеціалізованої вченої ради, к.б.н.

Молчанець О.В.

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

Актуальність теми. Останнім часом населення України знаходиться під інтенсивним впливом негативних факторів навколишнього середовища (Фролов В.М., Драник Г.Н., 1998), зокрема забрудненням довкілля великою кількістю важких металів та різноманітних токсичних речовин, а також під дією радіаційних чинників (Чумак А.А., 1998). Такий стан, у свою чергу, спричиняє послаблення імунітету, дисбаланс у роботі окремих його ланцюгів, а також веде до виникнення вторинних імунодефіцитів, корекція яких є необхідною умовою здоров'я як для конкретної людини, так і населення в цілому. З огляду на це, пошук препаратів природного походження, а також синтетичних сполук, які можуть бути використані для лікування згаданих патологій, вважається достатньо актуальною проблемою.

Відомо, що функції імунної системи організму можуть суттєво змінюватися (у бік підсилення або пригнічення) під впливом різноманітних ендогенних та екзогенних факторів. До таких факторів, зокрема, належить чисельна група імуноотропних препаратів (імуномодуляторів), які здатні модифікувати імунну відповідь, прямо впливаючи на імунокомпетентні клітини, або опосередковано, діючи через зміни біологічних реакцій організму (Новиков Д.К., Новикова В.И., Сергеев Ю.В., 2002; Сепиашвили Р.И., 2002; Хаитов Р.М., Пинегин Б.В., 2003). У сучасній лікарській практиці як імуномодулятори використовують різноманітні препарати – структурні компоненти та метаболіти мікроорганізмів, амінокислотні препарати, цитокіни, препарати рослинного та тваринного походження, синтетичні сполуки, мінеральні речовини, а також деякі комбіновані препарати.

Одними з найважливіших чинників неспецифічної резистентності організму, і, водночас, гомеостатичними засобами, є інтерферони (ІФН) (Ершов Ф.И., 1996). Останні належать до численної родини цитокінів і являють собою групу білків, яким притаманний цілий спектр активностей і, зокрема, імуномодуляторна дія. Такою ж дією в тій чи іншій мірі володіють і речовини – індуктори ІФН (Ершов Ф.И., Тазулахова Э.Б., 1989). Останні розглядаються зараз як досить перспективні імуномодуляторні препарати, що відрізняються універсально широким спектром етіотропної дії та потужним імунокоригуючим ефектом (Ершов Ф.И., Тазулахова Э.Б., 1999).

Раніш було встановлено, що молекулярні комплекси, які утворюються при взаємодії синтетичного низькомолекулярного ліганду – 2,7-біс[2-(диетиламіноетокси)-флуорен]-9-он дігідрохлориду (тилорону) з дріжджовою РНК (МК), здатні до індукції α/β -ІФН в умовах як *in vitro* так і *in vivo* (Карпов А.В., Жолобак Н.М., 1996). Оскільки здатність до індукції ІФН, як правило, супроводжується імуномодуляторною дією, логічно було припустити наявність останньої властивості у МК, як активного інтерферогена.

Мета роботи. Виявлення та вивчення імуномодуляторних властивостей МК за допомогою загальноприйнятих імунологічних тестів, та оцінка МК у якості імунокоригуючого засобу.

Завдання досліджень. Для досягнення поставленої в роботі мети вирішувалися наступні завдання:

1. Дослідити вплив МК на гуморальну та клітинну імунну відповідь до різних антигенів в досліджах *in vivo*;
2. Проаналізувати вплив МК на гіперчутливість сповільненого типу;
3. Дослідити вплив МК на проліферативну відповідь лімфоцитів під дією неспецифічних Т- і В-мітогенів;
4. Вивчити вплив МК на функціональну активність фагоцитувальних клітин;
5. Вивчити вплив МК на клітини імунної системи з периферичної крові (Т-, В-лімфоцити, моноцити, гранулоцити та природні кілерні клітини) в досліджах *in vitro*.

Об'єкти дослідження. В умовах *in vivo* досліджувалися лабораторні тварини – миші, на яких були створені наступні експериментальні моделі: а) модель гуморальної імунної відповіді; б) модель клітинної імунної відповіді – гіперчутливість сповільненого типу. В досліджах *in vitro* вивчали клітини периферичної крові людини I (0) групи.

Предмет дослідження: характер дії МК на функціонування імунної системи у експериментальних тварин в умовах *in vivo* та *in vitro* та вплив МК на окремі ланки імунної системи людини.

Методи дослідження. У наших дослідженнях визначення впливу молекулярного комплексу дріжджової РНК з тилороном на імунну відповідь, вивчення його впливу на функціональну активність окремих популяцій клітин імунної системи проводили на підставі комплексного використання імунологічних методів дослідження, цитологічних методів визначення гістоморфологічних змін лімфоїдних органів імунної системи (селезінки) та математичних методів обчислення індексу модуляції. Достовірність отриманих результатів досліджувалась статистичними методами за допомогою пакету прикладних програм Microsoft Excel.

Наукова новизна одержаних результатів. Вперше виявлена здатність молекулярного комплексу дріжджова РНК – тилорон до імуномодуляції, яку даний комплекс виявляє в умовах *in vivo* та *in vitro*. Вивчені основні характеристики імуномодуляторної активності МК в основних імунологічних тестах.

Вперше охарактеризований вплив МК на розвиток гуморальної імунної відповіді на Т-залежний антиген – еритроцити барана, та Т-незалежний антиген – ліпополісахарид *E. coli*. Продемонстрований імуносупресивний вплив МК на клітинну імунну відповідь у реакції гіперчутливості сповільненого типу (РГСТ). Вперше показано зниження інтенсивності ГСТ під впливом різних доз МК. Вперше встановлено, що різні дози МК пригнічують функціональну активність лімфоцитів в реакції бласттрансформації на різні мітогени (ФГА-, КонА- та ЛПС).

Вперше досліджені імуностимулюючі та імуносупресивні механізми впливу МК на фагоцитарну активність (процент фагоцитозу та число), клітинний метаболізм (НСТ-тест) клітин фагоцитів в системі *in vitro* у здорових донорів.

Виявлено, що МК підвищує функціональну активність клітин моноцитарно-макрофагальної ланки у здорових осіб.

При дослідженні впливу МК на функціонування системи неспецифічної резистентності встановлено, що МК в низьких концентраціях пригнічує цитотоксичну активність природних кілерних клітин периферичної крові, а у високих – підсилює у 2 рази. Вперше встановлено, що МК впливає на рівень експресії рецепторів на лімфоцитах (Лф) периферичної крові: на Т-Лф (CD3+), В-Лф (CD22+), а також на їх окремих субпопуляціях CD4+ (Т-хелперах) та CD8+(Т-цитотоксичних/ефекторних Лф).

Одержані в роботі результати можуть розглядатися, як досить важливий теоретичний та практичний матеріал щодо вивчення нових перспективних препаратів з імуномодуляторною активністю.

Практичне значення одержаних результатів.

Проведені вперше комплексні дослідження імуномодуляторної дії молекулярного комплексу дріжджова РНК з тилороном на моделях імунної відповіді. Робота має переважно теоретичну спрямованість. Водночас, одержані результати можуть бути використані для вивчення можливостей застосування речовин з інтерфероногенними властивостями для корекції імунодефіцитних станів, як один з етапів їх доклінічної апробації при розробці фармакопейної документації.

Результати роботи можуть бути використані також науковими закладами для подальшого вивчення імуномодуляторної здатності МК. Доцільно, на нашу думку, розпочати і клінічне випробування препарату як імуномодуляторного агента при вірусних і бактеріальних інфекціях.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Робота відповідає плану науково-дослідної роботи кафедри біотехнології мікробного синтезу Національного університету харчових технологій, а також виконувалась згідно тематики проекту Міністерства науки і освіти України: “Встановлення молекулярних механізмів індукції інтерферонів I типу (альфа/бета) в умовах *in vitro*” 2002 – 2003рр., № держреєстрації 0102U000557.

Особистий внесок здобувача. Особистий внесок здобувача полягає у визначенні актуальності та ступеня вивчення проблеми, виконанні методик експериментальних досліджень. Дисертація є самостійною роботою автора. Вивчення впливу МК на розвиток гуморальної імунної відповіді на різні по Т-залежності антигени, імунокомпетентні клітини периферичної крові людини в досліджах *in vitro*, на гіперчутливість сповільненого типу проведено в лабораторії імунології науково – дослідного лабораторного центру Національного медичного університету ім. О.О. Богомольця спільно з д.б.н. Гаркавою К.Г. та співробітниками лабораторії Колосовською О.С., Гавриш Т.М. та Павлович Г.В (зав. відділом д.мед.н., проф. Бордонос В.Г.). Дослідження впливу МК на функціональну активність фагоцитувальних клітин – в лабораторії імунології Київського НДІ фтизіатрії і пульмонології ім. акад. Ф.Г. Яновського у співпраці з чл.-кор. АМН України, д.мед.н., проф. Чернушенко К.Ф., к.б.н. Матвієнко Ю.О. та к.мед.н. Ільїнською І.Ф. Особисто дисертантом проведений статистичний

аналіз результатів досліджень, разом з науковим керівником д.б.н., проф. Карповим О.В. написані всі розділи дисертації, зроблені висновки. Всі дослідження проводилися за безпосередньої участі пошукувача.

Лич І.В. отримала відзнаку учасника четвертого конкурсу науково-технічних проектів “Інтелект молодих вчених – на службі столиці” за результати представлені у напрямі “Нові методи в діагностиці, лікуванні найпоширеніших хвороб. Новітні біотехнології” (2005).

Впровадження результатів дисертації. Матеріали проведених досліджень та літературного огляду використовуються в навчальному процесі на кафедрі біотехнології мікробного синтезу Національного університету харчових технологій у теоретичних та практичних спецкурсах “Основи імунології”, “Технологія одержання імунобіологічних препаратів” та “Методи імунологічних досліджень”, відображені у відповідних методичних рекомендаціях.

Апробація результатів досліджень. Основні положення дисертаційної роботи представлено у доповідях та публікаціях на вітчизняних та міжнародних конференціях та з'їздах: VIII Українському біохімічному з'їзді (Чернівці, 2002); конкурсі експериментальних робіт молодих дослідників Інституту мікробіології і вірусології НАН України (Київ, 2002); 7-й, 8-й та 10-й Пуцинській школі-конференції молодих вчених „Біологія – наука XXI століття” (Пушино, Росія, 2003, 2004, 2006); Міжнародній науково-практичній конференції студентів, аспірантів та молодих вчених, присвяченої 190-річчю з дня народження Тараса Шевченка та 170-річчю заснування Київського університету (Київ, 2004); II та III Всеукраїнській науково-практичній конференції "Біотехнологія. Освіта. Наука" (Львів, 2004, Харків, 2006); I та II Міжнародній науковій конференції студентів та аспірантів “Молодь і поступ в біології” (Львів, 2005, 2006); IV Національному з'їзді фармацевтів України (Харків, 2005); VII та VIII Українській науково-практичній конференції з актуальних питань клінічної і лабораторної імунології, алергології і імунореабілітації (Київ, 2005, 2006); Міжнародній конференції студентів та молодих учених “Modern Problems of Microbiology and Biotechnology” (Одеса, 2007).

Публікації. За матеріалами дисертації опубліковано 19 друкованих робіт, в тому числі 6 статей у виданнях, рекомендованих ВАК України, 13 тез конференцій і з'їздів.

Структура і об'єм роботи. Дисертація викладена на 145 сторінках машинописного тексту, ілюстрована 23 таблицями, 13 малюнками. Робота має традиційну структуру і складається з вступу, літературного огляду, викладення матеріалів і методів дослідження, розділу самостійних досліджень, розділу узагальнення одержаних результатів, висновків, списку використаних джерел, що складається з 149 вітчизняних джерел і джерел країн близького зарубіжжя та 48 далекого зарубіжжя.

Автор висловлює подяку науковому керівникові – д.б.н., проф. Карпову О.В., співробітникам НДЛЦ НМУ ім. О.О. Богомольця д.б.н. Гаркавій К.Г, д.мед.н. Бордоносу В.Г., а також Колосовській О.С та Гавриш Т.М. за постійну допомогу та увагу.

ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ

Розділ 1. Огляд літератури

В літературному огляді висвітлені сучасні відомості щодо сполук-імуномодуляторів, наводяться основні принципи їх класифікації та описується механізм дії, вказані переваги та недоліки їх застосування. Особливу увагу приділено інтерферонам та їх індукторам, описаним в окремому підрозділі.

Розділ 2. Матеріали і методи досліджень

В досліджах *in vivo* використовували мишей ліній СВА і Balb/c та безпородних мишей з віварію ІМБіГ НАН України. В досліджах *in vitro* використовували кров 0 (I) групи здорових донорів – волонтерів.

Компонентами МК були комерційний препарат дріжджової РНК та синтетичний препарат – 2,7-біс[2-(диетиламіно-етокси)-флуорен]-9-он дигідрохлорид (тилорон). МК утворюється при взаємодії одноланцюгової дріжджової РНК з тилороном і вважається одним з перспективних індукторів ІФН- α/β напівприродного походження завдяки наявності в його складі рибози та утворенню в структурі одноланцюгової РНК під дією тилорону чисельних дволанцюгових ділянок. Приготування розчину МК потрібної концентрації здійснювали шляхом прямого змішування відповідних розчинів тилорону і дріжджової РНК в буфері 0,01 М трис-НСІ (рН 6,8) і 0,05 М NaCl у співвідношенні 1:10 (М:М).

Як препарати порівняння використовували РНК, чистий тилорон та відомий індуктор ІФН- α/β рибонуклеїнової природи – ридостин (дволанцюгова РНК дріжджів *Saccharomyces cerevisiae*, НПО „Вектор”, Росія).

Для вивчення впливу МК на імунну систему експериментальних тварин у мишей моделювали гуморальну імунну відповідь використовуючи Т-залежний антиген (АГ) – еритроцити барана (ЕБ) і Т-незалежний АГ – ліпополісахарид (ЛПС *E.coli* 0111). Препарат МК вводили статевозрілим мишам лінії СВА внутрішньочеревинно в дозах 1,25 та 12,5 мг/кг ваги тварин. ЕБ вводили тваринам в оптимальній дозі 4×10^8 у 0,2 мл фізіологічного розчину внутрішньочеревинно, а ЛПС вводили в дозі 0,3 мг підшкірно. Антигени вводили одноразово. Контролем слугували тварини, яким вводили рівні об'єми ЕБ і ЛПС відповідно до групи. Мишей забивали шляхом цервікальної дислокації під легким ефірним наркозом.

У ході проведення досліджень визначали показники формування гуморальної імунної відповіді – індекси маси (ІМ) тимусу та селезінки, вміст лімфоїдних елементів в селезінці, вміст АПК у селезінці та титри імуноглобулінів в сироватці крові, а також рівні кисеньзалежного метаболізму Мф селезінки на 5-ту, 7-му та 14-у добу після імунізації у 7 тварин з кожної групи. Визначення індексів маси тимусу та селезінки проводили ваговим методом (Miche D., 1967; стефанов О.В., 2001). Визначення клітинного складу лімфоцитів селезінки проводили загальноприйнятим методом в її відбитках. Кількість антитілопродукуючих клітин (АПК) в селезінці мишей визначали методом прямого гемолізу за Єрне (1963). Методом пасивної гемаглютинації за Бойденом визначали рівень анти-тіл у сироватці крові (Вязов О.Е., 1967). Вплив МК на кисеньзалежний метабо-

лізм макрофагів селезінки мишей визначали шляхом постановки тесту відновлення нітросинього тетразолію (НСТ-тесту) (Нагоев Б.С., 1986).

Для індукції гіперчутливості сповільненого типу мишам лінії BALB/c вводили у подушечки обох задніх лап по 0,05 мл 0,9% розчину NaCl, у якому містилося 1×10^6 ЕБ (Гюллінг Е.В., Самбур М.Б., 1981). Одночасно з ЕБ мишам внутрішньочеревинно вводили МК в дозі 12,5 та 1,25 мг/кг ваги тварин. Через 4 доби в підошву задньої правої (дослідної) лапи вводили 0,05 мл фізіологічного розчину, який вміщував 1×10^8 ЕБ, а у ліву (контрольну) лапу – 0,05 мл фіз. розчину без ЕБ. Оцінку реакції проводили через 24 години за різницею мас дослідної (Д) і контрольної (К) лап. Ступінь збільшення маси правої лапки відносно контрольної лівої лапки виражали індексом реакції (ІР).

Вивчення мітогенної дії МК проводили *in vitro* за допомогою мікрометоду реакції бласттрансформації лімфоцитів (РБТЛ) по включенню [^3H]-тимідину в ДНК лімфоцитів (Фримель Г.Н., 1984) з використанням стандартних мітогенів: фітогемаглютиніну (ФГА), конканаваліну А (Кон А) та ліпополісахариду (ЛПС) *E.coli*.

Оцінку безпосереднього впливу МК на функціональну активність клітин імунного захисту проводили в тестах *in vitro*. Функціональний стан нейтрофільних гранулоцитів та моноцитів крові характеризували за їх здатністю поглинати частки латексу ($d=1,0 - 1,3$ мкм) з розрахунком проценту фагоцитозу (ПФ) – процентом фагоцитуючих клітин та фагоцитарного числа (ФЧ) – середньою їх активністю (Потапова О.Г., Хрустіков В.С. (1974) у модифікації Шатрова В.А. та співав. (1988)) та інтенсивністю їх кисеньзалежного метаболізму в НСТ-тесті за методом Нагоева Б.С. (1986). За цитохімічним коефіцієнтом (ЦХК) проводили оцінку активності пероксидазних систем (Нарциссов Р.П., 1970).

Цитотоксичну активність кілерних клітин визначали нерадіометричним методом, який базується на спекрофотометричному обліку гемоглобіну, що вийшов із зруйнованих кілерами еритроцитарних клітин-мішеней (ЕБ) у процесі їх спільної інкубації (Зимин Ю.И., Чуканов С.В., Каганов Б.С., 1983; Круглова И.Ф., 1998).

Визначення розеткоутворюючих клітин (РУК) проводили методом розеткоутворення з частинками, що вкриті моноклональними антитілами (Новиков Д.К., Новиков П.Д., 2000).

Статистичне оброблення отриманих даних було проведене на ПК Intel® Celer, цифровий матеріал у кожній окремій вибірці був перевірений та підтверджений на нормальний розподіл величин. Для чисельних даних розраховували середнє арифметичне, дисперсію та стандартне квадратичне відхилення. Інтервал надійності отримували з вірогідністю 95% (Лапач С.Н., Чубенко А.В., Бабич П.Н., 2000). Математичне оброблення результатів дослідження здійснювали за допомогою ліцензійних програмних продуктів які входили до пакету Microsoft Office Professional 2000.

Розділ 3. Результати та їх обговорення

Характерною властивістю, притаманною речовинам – імуномодуляторам, є їх потенційний вплив на формування в організмі дослідних тварин гуморальної та клітинної імунної відповіді. Тому для з'ясування наявності імуномодуляторної активності МК, на першому етапі наших досліджень, визначали його вплив на формування імунної відповіді: гуморальної імунної відповіді на тимусзалежний та тимуснезалежний антигени, клітинної імунної відповіді у реакції гіперчутливості сповільненого типу та проліферативної відповіді Лф мишей при мітогенному стимулюванні у реакції бласттрансформації.

Першим етапом досліджень імуномодуляторної здатності МК було оцінювання впливу цього препарату на первинні та вторинні органи імунної системи тварин, а саме тимус та селезінку (табл.1 та 2).

Таблиця 1

Вплив МК на величину індексу маси тимусу мишей СВА при імунній відповіді на ЕБ ($M \pm m$; $n = 7$)

Препарат, що вводився	Індекси маси тимусу (ІМ)		
	5 доба	7 доба	14 доба
Контроль (інтактні)	0,18 ± 0,01		
Контроль (ЕБ)	0,35 ± 0,01 [#]	0,37 ± 0,01 [#]	0,36 ± 0,01 [#]
МК 12,5 мг/кг	0,28 ± 0,01 ^{#•}	0,57 ± 0,01 ^{#•}	0,47 ± 0,01 ^{#•}
МК 1,25 мг/кг	0,47 ± 0,01 ^{#•*}	0,33 ± 0,01 ^{#•*}	0,38 ± 0,01 [#]
Дріжджова РНК	0,41 ± 0,01 ^{#*}	0,33 ± 0,01 ^{#•*}	0,39 ± 0,01 [#]
Тилорон	0,54 ± 0,02 ^{#•*}	0,33 ± 0,02 ^{#•*}	0,26 ± 0,01 ^{#•*}
Ридостин	0,48 ± 0,01 ^{#•*}	0,34 ± 0,01 ^{#*}	0,33 ± 0,01 ^{#*}

Примітки.

1. # - різниця в порівнянні з вихідним показником достовірна ($p < 0,05$).
2. • - різниця показника в порівнянні з відповідним показником контрольної групи (ЕБ) достовірна ($p < 0,05$).
3. * - різниця показника в порівнянні з відповідним показником групи тварин, які отримували 12,5 мг/кг МК, достовірна ($p < 0,05$).

Як свідчать дані табл.1, у тварин всіх груп імунізація ЕБ призводила до достовірного зростання індексу маси (ІМ) тимусу в усі дні дослідження. У мишей контрольної групи ІМ тимусу на 5 добу після введення антигену складав (0,35 ± 0,01) у.о. і майже не змінювався до 14 доби. У тварин, які отримали МК в дозі 1,25 мг/кг, ІМ тимусу на 5 добу імунної відповіді виявлявся достовірно вищим за контрольний (0,47 ± 0,01) у.о., після чого відбувалося суттєве його зменшення з подальшою стабілізацією на контрольному рівні. При введенні МК в дозі 12,5 мг/кг у мишей також відбувалося аналогічне збільшення ІМ тимусу, але воно запізнювалося на 2 доби і до 14 доби відбувалося зниження цього показника. Така динаміка зміни ваги тимусу при імунізації тварин ЕБ повністю відповідає даним літератури щодо дії деяких препаратів РНК у подібних умовах. Характерно, що подібна динаміка зміни значень ІМ спостерігалася і у випадку полірибонуклеотидного препарату порівняння – ридостину.

Результати визначення величин ІМ селезінки мишей також свідчили щодо суттєвих змін маси цього органу при формуванні імунної відповіді на введення ЕБ (табл.2). Але, на відміну від тимусу, в цьому випадку спостерігалось прогресуюче збільшення маси селезінки; це відбувалося в усіх дослідних групах тварин в усі дні дослідження.

Таблиця 2

**Вплив МК на величину індексу маси селезінки
мишей СВА при імунній відповіді на ЕБ ($M \pm m$; $n = 7$)**

Препарат, що вводився	Індекси маси (ІМ)		
	5 доба	7 доба	14 доба
Контроль (інтактні)	0,50 ± 0,03		
Контроль	1,01 ± 0,02 [#]	0,67 ± 0,01 [#]	0,57 ± 0,01
МК 12,5 мг/кг	2,0 ± 0,03 ^{#*}	0,64 ± 0,01 [#]	0,82 ± 0,02 ^{#*}
МК 1,25 мг/кг	1,18 ± 0,05 ^{**}	0,75 ± 0,03 [#]	0,74 ± 0,02 ^{#*}
Дріжджова РНК	0,46 ± 0,05 ^{**}	0,65 ± 0,03 [#]	0,61 ± 0,02 [*]
Тилорон	0,63 ± 0,04 ^{#**}	0,68 ± 0,01 [#]	0,62 ± 0,01 [*]
Ридостин	0,62 ± 0,04 ^{**}	1,25 ± 0,02 ^{#**}	0,62 ± 0,03 [*]

Примітка. Позначення аналогічні тим, що вказані в Табл.1.

Загалом же порівняльний аналіз динаміки зміни ваги селезінки й тимусу у тварин всіх дослідних груп продемонстрував, що оптимальний активуючий вплив МК мав місце у випадку його використання в дозі, рекомендованій раніш для інтерферогенезу (1,25 мг/кг). Останнє беззаперечно вказує на взаємозв'язок процесів інтерферогенезу і проліферації, оскільки відомо, що ІФН всіх трьох типів здатні стимулювати проліферацію як В-, так і Т-Лф.

Активация проліферативних процесів в селезінці підтверджувалася даними, отриманими при вивченні змін лімфоїдного складу клітин в процесі розвитку імунної відповіді на ЕБ. У тварин контрольної групи на 5 добу розвитку імунної відповіді спостерігалось дворазове збільшення кількості бластних клітин (лімфобластів та плазмобластів), а також плазмоцитів. У мишей, яким вводили МК в дозі 1,25 мг/кг, також спостерігалось суттєве зростання вмісту плазмобластів та плазмоцитів ($8,0 \pm 0,7$, $P < 0,05$; $7,5 \pm 0,5$, $p < 0,05$ відповідно) на 5-ту добу спостереження, яке виявилось вірогідно більшим, ніж в контрольній групі тварин. На 7-му добу імунної відповіді було зафіксовано подальше стрімке підвищення цих показників, після чого відбувалося їх зменшення до рівнів, вірогідно більших за контрольні. При введенні тваринам МК в дозі 12,5 мг/кг в селезінці на 5 добу відбувалося суттєве зростання кількості лімфобластів ($18,0 \pm 1,2$, $p < 0,05$). В той же час відносна кількість плазмобластів та плазмоцитів у цьому випадку, порівняно з контролем, також суттєво збільшувалася ($10,0 \pm 0,8$, $p < 0,05$; $10,0 \pm 0,1$, $p < 0,05$ відповідно).

Окрім складу популяції лімфоїдних клітин селезінки, важливим показником гуморальної ланки імунної системи, що змінюється під дією речовин з імуномодуляторними властивостями, є здатність Лф селезінки до антитілогенезу. Це проявляється у збільшенні кількості антитілопродукуючих клітин (АПК) та

продукції антитіл до Т-залежного антигену. Результати такого визначення наведені в табл. 3.

Таблиця 3

Вплив МК на вміст антитілопродукуючих клітин в селезінці мишей СВА при імунній відповіді на ЕБ ($M \pm m$; $n = 7$)

Препарат, що вводився	Кількість антитілопродукуючих клітин		
	5 доба	7 доба	14 доба
Контроль (ЕБ)	112,0 ± 3,3	84,0 ± 2,3	33,0 ± 0,8
МК 12,5 мг/кг	44,6 ± 1,9 [•]	155,0 ± 4,7 [•]	22,0 ± 1,0 [•]
МК 1,25 мг/кг	190,0 ± 4,0 ^{•*}	137,1 ± 4,1 ^{•*}	38,6 ± 1,7 ^{•*}
Дріжджова РНК	134,2 ± 1,8	98,6 ± 3,5	31,2 ± 1,4
Тилорон	83,0 ± 1,9 ^{•*}	68,4 ± 2,7 ^{•*}	29,1 ± 2,1
Ридостин	92,0 ± 4,1 ^{•*}	79,0 ± 1,5 [*]	39,0 ± 2,7 [*]

Примітка. Позначення аналогічні тим, що вказані в Табл.1.

При аналізі цих даних було виявлено наступні закономірності: введення МК тваринам дослідних груп призводило до збільшення вмісту АПК в селезінці, проте застосування цього препарату в дозі 1,25 мг/кг спричиняло більш ранній на 5 добу дослідження ($190,0 \pm 4,0$, $P < 0,05$), виразніший та триваліший ефект. Препарат РНК також збільшував вміст АПК у селезінці на 5 добу дослідження, на відміну від тилорону та ридостину, які дещо знижували цей показник у порівнянні з контролем.

Загалом одержані результати співпадають з даними літератури, оскільки тилорон та дріжджова РНК самі по собі, залежно від дози, здатні підсилювати продукцію антитіл, у той час як ридостин практично не призводить до збільшення кількості АПК в селезінці. Тому ми припускаємо, що МК активізує процеси збільшення вмісту АПК в селезінці за рахунок наявності у складі МК РНК.

Для визначення змін функціональної активності В-клітин в динаміці розвитку імунної відповіді на ЕБ та з'ясування характеру впливу на неї МК і препаратів порівняння визначали титри сироваткових гемаглютининів. Виявилось, що МК в дозі 1,25 мг/кг порівняно з ридостином проявляє більшу здатність до індукції синтезу антитіл. Це може свідчити щодо його підвищеної імуномодуляторної активності у цих дослідках.

Формування адаптивної імунної відповіді відбувається за умов обов'язкової участі Мф. Тому здатність імуномодуляторів до активації Мф є важливою характеристикою згаданих речовин. З огляду на це, а також враховуючи доведені раніш інтерферогенні властивості МК, які, у свою чергу, можуть сприяти активації Мф, проводили визначення рівнів кисеньзалежного метаболізму Мф селезінки у НСТ-тесті (табл.4).

Максимальний стимулюючий вплив на метаболічну активність Мф селезінки був зареєстрований на 7-у добу розвитку імунної відповіді на ЕБ при введенні МК в дозі 1,25 мг/кг одночасно з проведенням імунізації.

**Рівні кисеньзалежного метаболізму макрофагів селезінки мишей СВА
в динаміці їх імунної відповіді на ЕБ (М ± m; n = 7)**

Групи тварин	Показники	Час дослідження		
		5 доба	7 доба	14 доба
Контроль (інтактні)	НСТ (%)	31,0 ± 0,3		
	ЦХК (у.о.)	0,60 ± 0,01		
Контроль	НСТ (%)	38,0 ± 1,3 [#]	63,0 ± 1,4 [#]	59,0 ± 1,07 [#]
	ЦХК (у.о.)	0,60 ± 0,02	1,02 ± 0,02 [#]	0,72 ± 0,02 [#]
МК 12,5 мг/кг	НСТ (%)	48,0 ± 2,1 ^{#•}	55,0 ± 1,7 [#]	21,0 ± 0,9 ^{#•}
	ЦХК (у.о.)	0,67 ± 0,02	1,02 ± 0,02 [#]	0,32 ± 0,01 ^{#•}
МК 1,25 мг/кг	НСТ (%)	44,0 ± 2,1 ^{#•}	75,0 ± 1,5 ^{#•*}	37,0 ± 1,1 ^{#•*}
	ЦХК (у.о.)	0,90 ± 0,02 ^{#•*}	1,53 ± 0,02 ^{#•*}	0,44 ± 0,02 ^{#•}
Дріжджова РНК	НСТ (%)	34,0 ± 1,1 [*]	45,0 ± 2,3 ^{#•*}	47,0 ± 2,1 ^{#•*}
	ЦХК (у.о.)	0,45 ± 0,02 ^{#•*}	0,83 ± 0,02 ^{#•*}	0,74 ± 0,02 ^{#•}
Тилорон	НСТ (%)	63,0 ± 1,5 ^{#•*}	47,0 ± 2,1 ^{#•*}	33,0 ± 1,5 ^{#•*}
	ЦХК (у.о.)	1,00 ± 0,01 ^{#•*}	0,68 ± 0,02 ^{#•*}	0,47 ± 0,01 ^{#•*}
Ридостин	НСТ (%)	40,6 ± 1,2 [#]	53,0 ± 1,8 ^{#•}	43,0 ± 2,3 ^{#•*}
	ЦХК (у.о.)	0,62 ± 0,02	1,00 ± 0,01 [#]	0,63 ± 0,03 ^{#•*}

Примітка. Позначення аналогічні тим, що вказані в Табл.1.

Таким чином, можна стверджувати, що характер дії МК на формування гуморальної імунної відповіді на тимусзалежний антиген залежав від дози даного препарату. Так, введення МК в дозі 1,25 мг/кг одночасно з ЕБ мало стабільний стимулюючий ефект, який проявлявся достовірним збільшенням індексів маси тимусу та селезінки, зростанням кількості лімфобластів, плазмобластів та плазматичних клітин в селезінці, вмісту в ній антитілопродукуючих клітин і титрів сироваткових гемаглютининів, а також активацією кисеньзалежного метаболізму фагоцитів. В той же час при використанні цього препарату в дозі 12,5 мг/кг, попри підвищення метаболічної активності Мф і достовірне зростання індексів маси селезінки та вмісту в ній плазмоцитів, рівні специфічних антитіл не відрізнялися від контрольних значень.

З метою активації Т-незалежної імунної відповіді і дослідження впливу МК на формування імунної відповіді тварин імунізували Т-незалежним антигеном – ліпополісахаридом *E. coli* (ЛПС).

Одночасне введення тваринам ЛПС разом з МК в дозі 1,25 мг/кг супроводжувалося достовірним збільшенням індексів маси селезінки в усі терміни дослідження. В той же час при застосуванні МК в дозі 12,5 мг/кг зростання індексів маси селезінки у мишей СВА було більш повільним, з максимумом на 14 добу імунної відповіді. Слід відзначити, що введення самої по собі РНК суттєво знижувало ІМ селезінки протягом усього терміну дослідження. Така ж тенденція спостерігалась і при одночасному введенні мишам ЛПС та ридостину. Це може свідчити щодо універсальності дії препаратів нуклеїнової природи в цьо-

му випадку. Найбільших значень ІМ селезінки набували при введенні дослідним тваринам чистого тилорону одночасно з ЛПС (на 5-ту добу 1,23 проти 0,92; на 7-му добу 1,2 проти 0,99; на 14-ту добу 0,99 проти 0,69), що свідчило про найбільшу стимулюючу дію цього агента на проліферативні процеси в селезінці.

Для оцінки функціональної активності АПК та кількісних змін в динаміці імунної відповіді на ЛПС вивчали вміст цих клітин в селезінці та титри специфічних антитіл в сироватці крові. При цьому максимальний вміст АПК у мишей контрольної групи спостерігався на 5 добу дослідження, після чого відбувалося його скорочення, і на 14-добу після введення ЛПС цей показник зменшувався ще майже в 2,5 рази. У мишей, які отримували МК 12,5 мг/кг, зниження кількості АПК в селезінці по відношенню до контролю мало місце на 5 добу дослідження; на 7 та 14 добу цей показник досягав контрольних значень. У випадках застосування дріжджової РНК, тилорону та ридостину вміст АПК також виявився нижчим за контрольні значення, найменші показники були зареєстровані серед тварин, яким одночасно з ЛПС вводили тилорон.

Аналіз вмісту анти-ЛПС-специфічних антитіл дослідних тварин в процесі формування імунної відповіді на ЛПС виявив зниження титрів анти-ЛПС-антитіл в сироватках крові, що відбувається під дією як МК, так і його складових. Виключення складає лише доза МК 12,5 мг/кг.

Отже аналіз змін вмісту АПК в селезінці та титрів сироваткових анти-ЛПС-антитіл у дослідних тварин продемонстрував відсутність достовірного впливу МК в дозі 1,25 мг/кг на процеси антитілоутворення в розвитку імунної відповіді мишей СВА на тимуснезалежний антиген, наявність помірної стимулюючої дії цього препарату при його застосуванні в дозі 12,5 мг/кг та інгібуючий ефект препаратів порівняння.

Виходячи з важливої ролі Мф в імунитеті, як і у випадку Т-залежного антигену (ЕБ), здійснювали визначення впливу МК на кисеньзалежний метаболізм Мф в процесі формування імунної відповіді на ЛПС. У дослідях відмічено, що максимальний стимулюючий вплив на метаболічну активність фагоцитів селезінки був зареєстрований на 7-у добу розвитку імунної відповіді на ЛПС при введенні МК в дозі 1,25 мг/кг.

Загалом можна відзначити, що характер дії МК на формування гуморальної імунної відповіді на ЛПС, як і у випадку використання ЕБ, залежав від дози даного препарату. Введення тваринам складових МК та ридостину призводило до достовірного пригнічення антитілоутворення. Це явище, вірогідно, викликалося скороченням кількості активних АПК в селезінці. Незначна активація кисеньзалежного метаболізму Мф мала місце лише при застосуванні РНК та ридостину й виключно в ранні терміни після введення ЛПС. В подальшому, як і при використанні тилорону, зареєстровано стрімке виснаження функціонального резерву цих клітин.

Оцінювання клітинного імунітету при дослідженні потенційних імуномодуляторів традиційно проводять на основі тестування здатності організму тва-

рин до індукції реакції гіперчутливості сповільненого типу (РГСТ) при введенні ЕБ (рис.1).

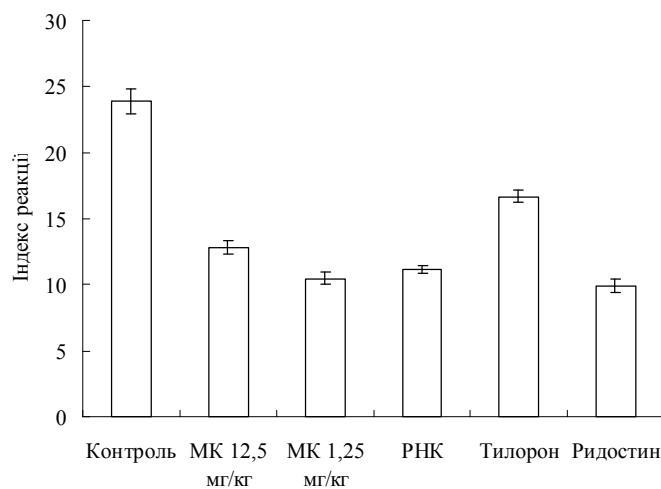


Рис. 1. Вплив МК та препаратів порівняння на інтенсивність РГСТ

Отримані результати, які наведені на рис.1 продемонстрували, що в той час, коли індекс реакції (ІР) в контрольній групі склав $(23,9 \pm 0,9)\%$, в усіх інших групах він виявився достовірно меншим. Зниження інтенсивності ГСТ під впливом дози 1,25 мг/кг МК сягало 56%, пригнічення цієї реакції при застосуванні дози, вдесятеро більшої за попередню, було достовірно меншим на 46,3% ($p < 0,05$). Пригнічуюча дія ридостину на показник РГСТ виявилася найсуттєвішою 58,6%, а пригнічення РГСТ під впливом тилорону – найменш виразним 30%. Пригнічуюча дія РНК на показник РГСТ сягала 53%.

При вивченні впливу різних доз МК на ФГА-, КонА- та ЛПС-індуковану реакцію бласттрансформацію Лф (РБТЛ), нами був виявлений досить суттєвий супресивний ефект цього препарату. При цьому супресивна дія МК була достатньо вираженою у всіх дослідних концентраціях.

Важливим критерієм оцінювання біологічного впливу будь-якого агенту на імунну систему організму є його прояви на рівні клітини. Тому подальші дослідження імуномодуляторних властивостей МК проводили в умовах *in vitro*, використовуючи як моделі лімфоїдні клітини крові здорових донорів: Лф, НГ, Мн, а також ПК-клітини.

На першому етапі проводили вивчення поглинальної здатності НГ за допомогою латексного тесту. Виявилось, що при нормальній фагоцитарній активності клітин ($32,6 \pm 0,9\%$) НГ, величини проценту фагоцитів (ПФ) до і після інкубації клітин з МК та препаратами порівняння недостовірно відрізнялися один від одного. Щодо фагоцитарного числа (ФЧ), то цей показник також залишався практично незмінним у всіх дослідних цієї серії. В НСТ-тесті нами теж встановлена відсутність впливу МК та препаратів порівняння як на кількість НСТ-позитивних клітин, так на їх функціональну активність. Виключення складає лише МК в концентрації 12,5 мг/мл, який достовірно пригнічував кількість НСТ-позитивних клітин.

Аналогічні дослідження впливу МК на функціональну активність фагоцитуювальних клітин проводили на моделі Мн (рис. 2).

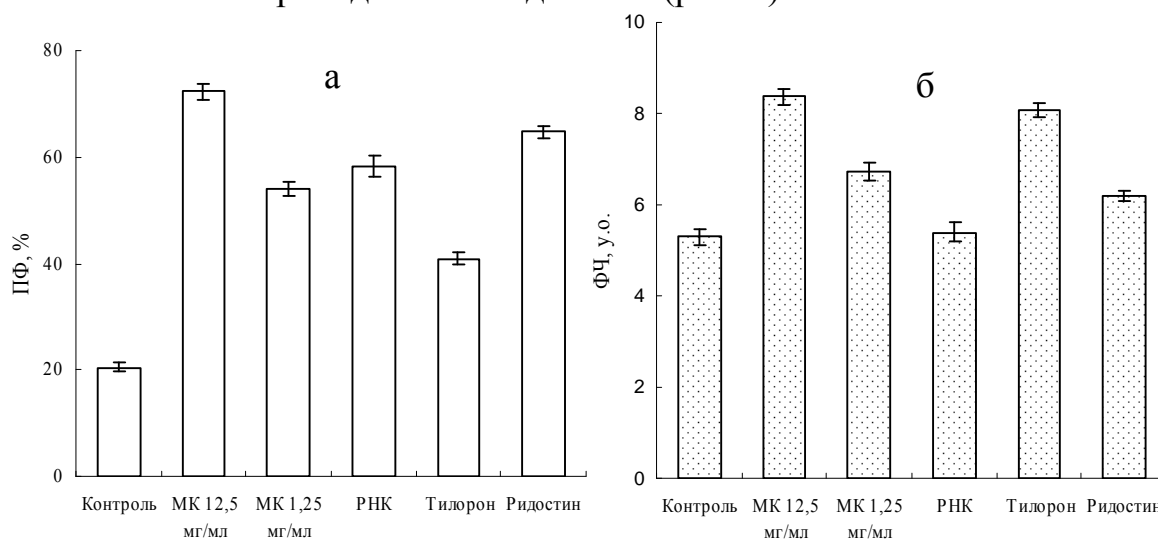


Рис.2. Вплив МК та препаратів порівняння на показники фагоцитозу Мц

Так, МК в концентрації 12,5 мг/мл підвищував ПФ у 3,5 рази (рис. 2.а) та ФЧ майже в 2 рази (рис. 2.б). При застосуванні МК в концентрації 1,25 мг/мл спостерігається збільшення ПФ у 2,5 рази, при цьому ФЧ збільшується незначно на 27%. При інкубації досліджуваних клітин Мц з РНК та ридостином також спостерігається достовірне підвищення ПФ (в 2,9 рази та 3,2 рази відповідно), але ФЧ залишається на рівні контролю. Найменший стимулюючий ефект на кількість активних клітин, які поглинули латекс спостерігається при додаванні тилорону (ПФ збільшується в 2 рази). При цьому середня кількість частинок, яку поглинула одна фагоцитуюча клітина (ФЧ) збільшується у 1,5 рази. Відсоток НСТ-позитивних Мн, як і показник ЦХП, під дією МК дещо збільшувалися. У той же час ці показники незначно знижувалися під дією тилорону та ридостину. Таким чином, клітини Мц виявилися більш чутливими до активації досліджуваними препаратами МК.

Однією з важливих характеристик, що змінюється під дією потенційних імуномодуляторів на неспецифічний імунітет, є цитотоксична активність ПК-клітин. З огляду на це досліджували вплив МК на ПК-клітини і ймовірну зміну їх спонтанної (СЦ) та антитілозалежної (АЗКЦ) цитотоксичності.

Як видно з наведених даних (рис. 3), цитотоксична активність ПК-клітин та клітин, що відповідають за антитілозалежну цитотоксичну активність, пропорційно збільшується зі збільшенням концентрації МК. Можливо, що така дія МК пов'язана з особливим функціональним станом субпопуляції ПК-клітин та якісною і кількісною зміною їх метаболітів, а також наявністю чутливих рецепторів до складових компонентів МК за певний проміжок часу.

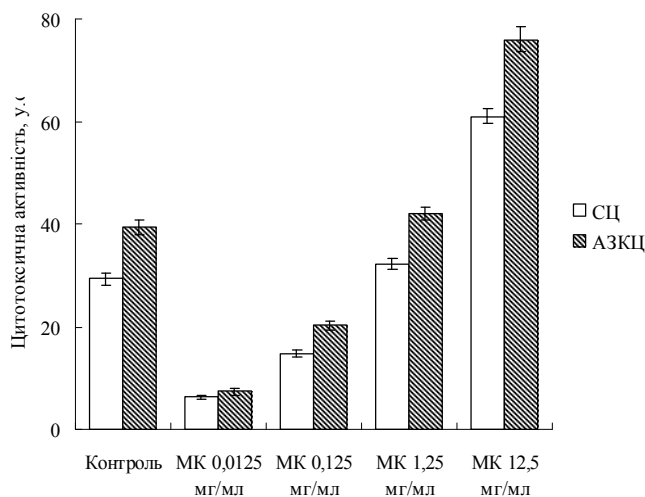


Рис. 3. Вплив МК на спонтанну та антитілозалежну цитотоксичність ПК-клітин

З метою більш поглибленого оцінювання впливу потенційного імуномодулятора на стан клітинного імунітету досліджували вплив МК на рівень експресії рецепторів на Лф периферичної крові: на Т-Лф (CD3+), В-Лф (CD22+), а також на їх окремих субпопуляціях (CD4+ та CD8+). Для цього використовували метод розеткоутворення Лф з частинками, вкритими МКАТ проти CD3+ (Т-Лф), CD4+ (Т-хелпери) та CD8+ (Т-цитотоксичні/ефекторні Лф). У цих досліджах нами був виявлений достовірний дозозалежний ефект впливу МК на реакції розеткоутворення.

Підсумовуючи отримані нами дані слід зупинитися на такому аспекті. Як відомо, препарати дріжджової РНК, що складаються з різних нуклеотидних ланцюгів, які, як вважають, мають довжину від 5 до 25 нуклеотидів. Враховуючи це, а також те, що склад олігонуклеотидів може бути різним, оскільки він комбінується чотирма мононуклеотидами – аденозиновими, гуанозиновими, цитидиновими та уридиновими, існує думка, що різні компоненти (або олігонуклеотиди) які складають даний препарат, здійснюватимуть неоднозначний вплив на імунологічні реакції. Більш того, сумарний ефект препарату може складатися з різноспрямованих ефектів його складових. Так, при вивченні впливу чотирьох мононуклеотидів РНК на гуморальну відповідь, яку оцінювали за утворенням АПК після імунізації ЕБ, виявилось, що 5'-АМФ викликав у тварин пригнічення імунної відповіді, тоді як 5'-ЦМФ та 5'-УМФ обумовлювали її суттєве підсилення, яке подібне з ефективністю самого препарату РНК, а 5'-ГМФ володів найменш вираженим ад'ювантним ефектом. Це, на наш погляд, пояснює відсутність чітких кореляцій у дії МК на різні ланки імунітету, виявлену у наших дослідженнях.

З огляду на вищезгадане, можна зробити припущення, що всі ефекти МК, пов'язані з імуномодуляцією, викликаються головним чином його полінуклеотидним компонентом – дріжджовою РНК. Згідно сучасних уявлень імуномодуляторна дія РНК тісно пов'язана з метаболізмом циклічних нуклеотидів, пул яких може поповнюватися за рахунок розпаду РНК. Згідно цьому ключову роль

у цьому явищі відіграють цАМФ-залежні кінази, які активують два типи реакцій: синтез специфічного для даних клітин білка і реакції каталізу для вивільнення енергії. При цьому циклічні нуклеотиди обумовлюють не тільки певні метаболічні процеси спеціалізованих клітин, але і проліферацію і диференціювання клітин.

Разом з тим слід відмітити, що циклазна внутрішньоклітинна регуляція метаболізму вірогідно має широке розповсюдження, але її ефекторна функція неоднозначна. Так, якщо існують відомості щодо стимуляції у Т-клітинах (тимocyтах) метаболізму, їх проліферації і диференціюванні при збільшенні рівня цАМФ, по відношенню до інших клітин такі відомості суперечливі.

Ще одним механізмом активуючої дії РНК може виявитися підвищення експресії певних рецепторів на мембрані клітин (як і відповідні зміни самої мембрани), що призводить до підсилення рецепції певних нейрогормонів, які активують клітини. Так, це може підсилювати активацію гуанілатциклази; остання, підвищуючи внутрішньоклітинний рівень цГМФ, здатна активувати Лф і Мф.

І, нарешті, імуномодуляторна дія РНК (і, у такий же спосіб, МК) може бути пов'язана з певними медіаторами білкової природи. Як відомо, міжклітинна сигналізація в імунній системі здійснюється шляхом безпосередньої контактної взаємодії клітин або за допомогою певних медіаторів міжклітинних взаємодій. Той факт, що структура молекули МК (і, до певної міри, дріжджова РНК) являє собою подвійну спіраль, обумовлює їх здатність індукувати ІФН І типу як в організмі, так і в культурах відповідних клітин. З іншого боку, як зараз встановлено, процес індукції за допомогою полінуклеотидних індукторів не обмежується лише ІФН, але і зачіпає цілий ряд цитокінів. Останні, у свою чергу, можуть бути причиною запуску складних каскадів біохімічних реакцій, що проявляються у вигляді імуномодуляторних клітинних ефектів.

Все викладене вище може свідчити щодо перспективності МК, як досить потужної сполуки – імуномодулятора. Враховуючи раніш встановлену відносно низьку токсичність препаратів МК, а також досить низьку вартість його складових, можна сподіватися на подальше впровадження цього комплексу у клінічну практику у якості імунокоригуючого препарату широкого спектру дії.

ВИСНОВКИ

У дисертаційній роботі представлено експериментальні і теоретичні узагальнення та практичне вирішення наукової задачі – встановлення нових імуномодуляторних властивостей молекулярного комплексу дріжджова РНК-тилорон (МК), а саме – його здатності впливати на імунореактивність організму та функціональні особливості клітин імунного захисту.

1. Вперше доведено, що МК володіє властивостями, які дозволяють віднести його до групи імуномодуляторів з дозозалежним характером дії на різні ланки функціонування імунної системи.

2. Встановлено, що при дії МК на гуморальну імунну відповідь за умов використання різних по Т-залежності антигенів спостерігається:

- дозозалежна стимулююча дія МК на формування імунної відповіді на еритроцити барана. Це проявляється у збільшенні індексів маси тимусу і селезінки, зростанні кількості лімфобластів, плазмобластів і плазматичних клітин в селезінці, вмісту в ній антитілопродукуючих клітин і зростанні титрів сироваткових імуноглобулінів, а також активації кисеньзалежного метаболізму макрофагів при застосуванні МК в дозі 1,25 мг/кг.

- дозозалежний пригнічуючий вплив на формування імунної відповіді на ліпополісахарид. При цьому мало місце підвищення індексів маси селезінки за рахунок збільшення вмісту плазматичних клітин, але це не спричинило стимулюючого впливу на антитілогенез (доза МК 12,5 мг/кг).

3. Показано, що зниження інтенсивності реакції гіперчутливості сповільненого типу (РГСТ) під впливом дози 1,25 мг/кг МК сягало 56%, пригнічення цієї реакції при застосуванні дози, вдсятеро більшої за попередню становило 46,3%. В зв'язку з тим, що МК знижує інтенсивність РГСТ, існує принципова можливість його подальшого застосування для пригнічення алергічних реакцій, обумовлених ГСТ.

4. Встановлено, що різні дози МК супресивно впливають на ФГА-, КонА-та проходження ЛПС-індукованої реакції бласттрансформації лімфоцитів.

5. Доведено, що в умовах *in vitro* МК сприяє покращенню функціонування клітин моноцитарно-макрофагальної системи через підвищення проценту фагоцитозу в 2,5 – 3,5 рази, фагоцитарного числа в 2 рази, а також кисеньзалежного клітинного метаболізму за оцінкою показників НСТ-тесту.

6. Показано, що МК проявляє дозозалежний модулюючий вплив на цитолітичну активність природних кілерних клітин: за низьких і середніх концентрацій він чинить пригнічуючий вплив, а за високих – стимулюючий.

7. Доведено, що МК впливає на рівень експресії рецепторів на лімфоцитах (Лф) периферичної крові: на Т-Лф (CD3+), В-Лф (CD22+), а також на їх окремих субпопуляціях CD4+ (Т-хелпери) та CD8+(Т-цитотоксичних/ефекторних Лф). Характер впливу залежав від концентрації МК.

СПИСОК ОСНОВНИХ РОБІТ, ЩО ОПУБЛІКОВАНІ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

За темою дисертації опубліковано 19 наукових праць, із них – 6 статей у фахових виданнях та 13 тез доповідей конференцій та з'їздів.

1. Ткаченко І.В. Вивчення імуномодулюючих властивостей молекулярного комплексу дріжджова РНК – тилорон / І.В. Ткаченко, О.В. Карпов, К.Г. Гаркава, С.В. Антоненко, Ю.М. Миронюк // Вісник Київського національного університету імені Тараса Шевченка. Серія Біологія. – 2003. – № 42 – 43. – С. 104-105.

2. Ткаченко І.В. Особливості імунорегулюючого впливу молекулярного комплексу дріжджова РНК – тилорон гідрохлорид в системі *in vitro* / І.В. Ткаченко, О.В. Карпов, К.Г. Гаркава // Імунол. та алергол. – 2004. – №3. – С. 29-32.

3. Ткаченко І.В. Вплив комплексного індуктора інтерферону I типу молекулярного комплексу дріжджова РНК – тилорон на функціональну активність імунокомпетентних клітин / І.В. Ткаченко, О.В. Карпов, К.Г. Гаркава, О.С. Колосов-

ська, Г.В. Павлович // Клінічна та експериментальна патологія. – 2004. – Т.3, № 2. – С. 379-378.

4. Ткаченко І.В. Імунотропні властивості молекулярного комплексу дріжджова РНК-тилорон гідрохлорид, індуктора інтерферонів першого типу / І.В. Ткаченко, О.В. Карпов, К.Г. Гаркава // Вісник Львівського університету, серія біологічна – 2005. – Вип. 39. – С. 141-147.

5. Ткаченко И.В. Аллергенные и иммуностропные свойства молекулярного комплекса дрожжевая РНК–тилорон гидрохлорид / И.В. Ткаченко, А.В. Карпов, Е.Г. Гаркавая // Журн. микробиол. эпидем. и иммунобиол. – 2006. – №2. – С.70-74.

6. Загальна характеристика імуномодуляторів та їх класифікація [Електронний ресурс] / І.Ф. Ільїнська, І.В. Копосова, І.В. Ткаченко // Офіційний сайт Національного інституту фтизіатрії та пульмонології. – 2007. – Режим доступу до журн.: <http://www.ifp.kiev.ua/index.htm>

7. Ткаченко І.В. Імунологічні аспекти дії у системі in vitro молекулярного комплексу дріжджова РНК–тилорон гідрохлорид / Ткаченко І.В., Гаркава К.Г., Супрунюк І.М. // Укр. біохім. журн.: Матеріали VIII Укр. біохім. з'їзду (1–3 жовтня 2002р., Чернівці). – 2002. – Т.74, №4б (додаток 2) – С. 171-182.

8. Ткаченко И.В. Оценка иммуномодулирующего действия молекулярного комплекса дрожжевая РНК–тилорон гидрохлорид / Ткаченко И.В., Карпов А.В., Гаркавая Е.Г. // Сборник тезисов 7-ой Пущинской школы-конф. молодых ученых “Биология – наука XXI века” (14–18 апреля 2003г., Пущино). – С.45.

9. Ткаченко И.В. Влияние комплексного индуктора интерферона I типа молекулярного комплекса дрожжевая РНК-тилорон гидрохлорид на иммунный ответ / Ткаченко И.В., Карпов А.В., Гаркавая Е.Г. // Сборник тезисов 8-ой Пущинской школы-конф. молодых ученых “Биология – наука XXI века” (17–21 мая 2004г., Пущино). – Пущино, 2004. – С. 131.

10. Ткаченко І.В. Вивчення біологічних ефектів дії молекулярного комплексу дріжджова РНК – тилорон гідрохлорид в організмі / І.В. Ткаченко, О.В. Карпов, К.Г. Гаркава / Шевченківська весна. Матеріали міжн. наук.-практ. конф. студентів, аспірантів та молодих вчених, присвяченої 190-річчю з дня народження Тараса Шевченка та 170-річчю заснування Київського університету. – К., 2004, Випуск II. – С. 25-26.

11. Ткаченко І.В. Вплив молекулярного комплексу дріжджова РНК-тилорон гідрохлорид на первинну імунну відповідь / І.В. Ткаченко, О.В. Карпов, К.Г. Гаркава, Т.П. Пирог // Біотехнологія. Освіта. Наука: Збірник тез II Всеукр. наук.-практ. конф. присвяченої 160-річчю Національного ун-ту “Львівська політехніка” (6 – 8 жовтня 2004 р., Львів). – Львів, 2004. – С. 90.

12. Ткаченко І.В. Вплив молекулярного комплексу дріжджова РНК – тилорон, індуктора інтерферону I типу на клітинну імунну відповідь / І.В. Ткаченко, К.Г. Гаркава, О.В. Карпов // Молодь і поступ біології: Збірник тез I Міжн. наук. конф. студентів та аспірантів (11–14 квітня 2005р., Львів). – Львів: СПОЛОМ, 2005. – С. 105.

13. Ткаченко І.В., Гаркава К.Г., Карпов О.В. Імунотропні та алергенні властивості молекулярного комплексу дріжджова РНК – тилорон // Матеріали IV Націон. з'їзду фармацевтів України (28-30 вересня 2005р., Харків). - Харків: вид. НФаУ, 2005. – С. 369-370.

14. Ткаченко І.В. Імунотропні ефекти молекулярного комплексу дріжджова РНК-гідрохлорид / Ткаченко І.В., Гаркава К.Г., Карпов О.В. // Тези доповідей VII Української наук.-практ. конф. з актуальних питань клін. і лаборант. імунол., алергол. та імунореабілітації. Імунол. та алергол. – К., 2005 – Т.3 – С.84.

15. Ткаченко І.В. Вплив комплексного індуктора інтерферона на функціональну активність лейкоцитів крові / Ткаченко І.В., Карпов О.В. // Молодь і поступ біології: Збірник тез II Міжн. наук. конф. студентів та аспірантів (21 – 24 березня 2006 р., Львів). – Львів: СПОЛОМ, 2006. – С.325-326.

16. Ткаченко И.В. Функциональная активность лейкоцитов крови под действием интерфероногенного молекулярного комплекса / И.В. Ткаченко, А.В. Карпов // Сборник тезисов 10-й Пущинской школы-конф. молодых уч. “Биология – наука XXI века” (17 – 21 апреля 2006 г., Пущино). – Пущино, 2006. – С. 167.

17. Ткаченко І.В. Функціональна активність фагоцитів крові під дією молекулярного комплексу дріжджова РНК – тилорон гідрохлорид / І.В. Ткаченко, К.Г. Гаркава, О.В. Карпов // Тези доповідей VIII Укр. наук.-практ. конф. з актуальних питань клінічної і лабораторної імунології, алергології та імунореабілітації. – Імунол. та алергол. – К., 2006. – №2 – С.34.

18. Tkachenko I.V. Primary evaluation of immunomodulating properties of a molecular complex formed by the yeast RNA and tilorone / I.V. Tkachenko, E.G. Garkava, A.V. Karpov // Биотехнология. Образование. Наука. Практика: Сборник тезисов III Всеукр. науч.-практ. конф. с междунар. участием (18-20 октября 2006 р.). – Харьков, 2006. – С.24.

19. Tkachenko I. Immunomodulating effect of a molecular complex including yeast RNA and tilorone / I. Tkachenko, K. Garkava, O. Karpov / Modern problems of microbiology and biotechnology: The young scientists' and students' international scientific conference. (28-31, May 2007, Odesa) Abstracts. Odesa, 2007. – P.159.

АНОТАЦІЯ

Лич І.В. Імуномодуляторні властивості молекулярного комплексу дріжджова РНК-тилорон – Рукопис.

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.09 – імунологія. – Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Київ, 2008.

Дисертація присвячена виявленню та вивченню імуномодуляторних властивостей молекулярного комплексу дріжджова РНК-тилорон (МК), його здатності впливати на імунореактивність організму та функціональні особливості клітин імунного захисту, а також оцінюванню МК у якості імунокоригуючого засобу.

Встановлено, що при дії МК на гуморальну імунну відповідь за умов використання різних по Т-залежності антигенів відбувається дозозалежна стимулююча дія препарату на формування імунної відповіді на еритроцити барана, а

також його дозозалежний пригнічуючий вплив на формування імунної відповіді на ліпополісахарид. Показано, що МК знижує інтенсивність реакції гіперчутливості сповільненого типу. Досліджено, що під впливом різних доз МК на ФГА-, КонА- та проходження ЛПС-індукованої реакції бласттрансформації лімфоцитів, спостерігається супресивний ефект дії цього препарату.

В умовах *in vitro* доведено, що МК сприяє покращенню функціонування клітин моноцитарно-макрофагальної системи через підвищення проценту фагоцитозу (у 2,5 – 3,5 рази), фагоцитарного числа (у 2 рази), а також підвищення кисеньозалежного клітинного метаболізму. МК виявляє також дозозалежний модулюючий вплив на показники цитолітичної активності природних кілерних клітин: за низьких і середніх концентрацій відбувається пригнічення, за високих – стимуляція цієї активності. Доведено, що МК впливає на рівень експресії рецепторів на лімфоцитах периферичної крові. Характер впливу залежав від концентрації МК.

Ключові слова: дріжджова РНК, тилорон, імуномодулятор, імунна відповідь, лімфоцити, фагоцитоз.

АННОТАЦІЯ

Лыч И.В. Иммуномодуляторные свойства молекулярного комплекса дрожжевая РНК-тилорон – Рукопись.

Диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.00.09 – иммунология. – Киевский национальный университет имени Тараса Шевченко, Киев, 2008

Диссертация посвящена выявлению и изучению иммуномодуляторных свойств молекулярного комплекса дрожжевая РНК-тилорон (МК), его способности влиять на иммунореактивность организма и функциональные особенности клеток иммунной системы, а также оценке МК в качестве иммунокорректирующего препарата.

Ранее было установлено, что молекулярные комплексы, образующиеся при взаимодействии синтетического низкомолекулярного лиганда - гидрохлорида тилорона, с дрожжевой РНК (МК), способны индуцировать синтез α/β -интерферонов (α/β -ИФН) в условиях как *in vivo*, так и *in vitro*. Поскольку интерферогенные препараты, как правило, обладают в той или иной мере иммуномодуляторными свойствами, была проведена оценка таких свойств МК.

Установлено, что при действии молекулярного комплекса *in vivo* на гуморальный иммунный ответ при условии использования разных по Т-зависимости антигенов наблюдается дозозависимое стимулирующее действие препарата на формирование иммунного ответа на эритроциты барана, а также его дозозависимое угнетающее действие на формирование иммунного ответа на липополисахарид. Показано, что МК статистически достоверно снижает интенсивность ГЗТ. В связи с этим существует возможность его применения для подавления аллергических реакций, обусловленных ГЗТ. При определении пролиферативной активности лимфоцитов под действием МК исследовано, что под влиянием различных доз МК на ФГА-, КонА- та проходжение ЛПС-индуцированной ре-

акции бласттрансформации, наблюдается супрессирующее действие этого препарата.

В условиях *in vitro* доказано, что МК стимулирует функционирование системы клеток моноцитарно-макрофагального ряда путем повышения процента фагоцитоза (в 2,5 – 3,5 раза), фагоцитарного числа (в 2 раза), а также повышения кислородзависимого метаболизма. МК проявляет также дозозависимое модулирующее действие на показатели цитолитической активности натуральных киллерных клеток: при использовании низких и средних концентраций наблюдается угнетение, при высоких – стимуляция этой активности. Также доказано, что МК влияет на уровень экспрессии рецепторов на лимфоцитах периферической крови. Характер влияния зависел от дозы МК.

Таким образом, результаты наших исследований показали, что МК является выраженным иммуномодулятором, позволяющим посредством активации или супрессии различных звеньев иммунной системы влиять на иммунологическую активность организма.

Ключевые слова: дрожжевая РНК, тилорон, иммуномодулятор, иммунный ответ, лимфоциты, фагоцитоз.

SUMMARY

Lych I.V. Immunomodulating properties of a molecular complex formed by the yeast RNA and tilirone. – Manuscript.

Thesis for obtaining a degree of candidate of biological sciences. Speciality: 03.00.09 – immunology. Taras Shevchenko National University of Kyiv, Kyiv, 2008.

Dissertation deals with detection and study of immunomodulatory properties of a molecular complex including yeast RNA and tilirone (MC). The author investigates its ability to influence the organism's immunoreactivity and functional properties of cells participating in the immune defense. The MC was also studied as a immunocorrection agent.

The MC was shown to change the immune response against different T-dependent antigens; the drug effect on the establishment of immune response to sheep erythrocytes is dose-dependent. The author shows also the MC dose-dependent inhibitory effect on the development of immune response against lipopolysaccharide (LPS). The MC was shown to decrease the intensity of delayed hypersensitivity reaction (DHR); this fact may demonstrate the MC may be useful as an inhibitor of the allergic reactions due to the DHR. The MC shows the immunosuppressive effect in experiments with PGA-, ConA- and LPS-induced reactions of lymphocytes blasttransformation.

In vitro experiments suggest the MC to perfect the activity of monocyte-macrophageal system via the increase of phagocytosis percent (by 2,5-3,5 times), phagocyte number (by 2 times); the MC accelerates also the oxygen-dependent cell metabolism. The MC demonstrates also a dose-dependent modulatory effect on indices of cytolytic activity of natural killer cells: low and moderate MC concentrations inhibit this activity, high concentration stimulates it. The MC was also proved to influence on the receptor expression level on peripheral blood lymphocytes.

Key words: yeast RNA, tilirone, immunomodulator, immune response, lymphocytic cell.