

УДК: 612.017.1+615.281.8+612.015.348

**ІМУНОМОДУЛЮЮЧІ ВЛАСТИВОСТІ
ІНТЕРФЕРОНІНДУКУЮЧОГО МОЛЕКУЛЯРНОГО КОМПЛЕКСУ
ДРІЖДЖОВА РНК – ТИЛОРОН**

ЛИЧ І.В., СКРОЦЬКА О.І., КАРПОВ О.В.

Національний університет харчових технологій, м. Київ

РЕЗЮМЕ

ИММУНОМОДУЛИРУЮЩИЕ СВОЙСТВА

ИНТЕРФЕРОНИНДУЦИРУЮЩЕГО МОЛЕКУЛЯРНОГО

КОМПЛЕКСА ДРОЖЖЕВАЯ РНК – ТИЛОРОН

ЛЫЧ И.В., СКРОЦКАЯ О.И., КАРПОВ А.В.

Национальный университет пищевых технологий, г. Киев

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

В условиях *in vitro* доказано, что молекулярный комплекс дрожжевая РНК-тилорон (МК) стимулирует функционирование системы клеток моноцитарно-макрофагального ряда, о чем свидетельствует повышение процента фагоцитоза (в 2,5 – 3,5 раза), фагоцитарного числа (в 2 раза), а также увеличение интенсивности кислородзависимого метаболизма. МК оказывает также дозозависимое модулирующее действие на цитолитическую активности натуральных киллерных клеток: при использовании низких и средних концентраций МК наблюдается угнетение, при высоких – стимуляция этой активности. Также доказано, что МК влияет на уровень экспрессии рецепторов на лимфоцитах периферической крови. Характер данного влияния зависел от дозы МК.

SUMMARY

IMMUNOMODULATING PROPERTIES OF A INTERFERONINDUSED MOLECULAR COMPLEX FORMED BY THE YEAST RNA AND TILORONE

LYCH I., SKROTSKA O., KARPOV O.

National University of Food Technologies

Key words: yeast RNA, tilorone, immunomodulator, lymphocytic cells, phagocytosis.

In *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 MS was also proved to influence on the receptor expression level on peripheral blood lymphocytes.

Багаторічний досвід клінічного використання препаратів інтерферонів (ІФН) I типу (α, β -ІФН), яким притаманна протівірусна, імуномодулююча та антипроліферативна дія [1, 2], дозволив встановити їх значну ефективність для профілактики та лікування вірусних, бактеріальних і деяких онкологічних захворювань. Тими ж властивостями, як встановлено, у тій чи іншій мірі володіють і деякі сполуки індуктори синтезу ІФН [3 – 5], зокрема, тилорон [6, 7].

Раніше було встановлено, що перспективним індуктором ІФН I типу є молекулярні комплекси (МК), які утворюються при взаємодії дріжджової РНК з тилороном [8]. Отримання комплексних препаратів на основі штучних та природних сполук – це новий, перспективний напрямок у фармацевтичній практиці. Так, дріжджова РНК є природною сполукою, до якої в імунній системі є філогенетична адаптація. Штучний гаптен (в даному випадку – тилорон) має певну адресну імунотропну дію [6 – 7, 9], він є ксенобіотиком для організму людини, проти якого індукуються захисні реакції. У даній роботі ми мали на меті дослідити вплив МК на імунокомпетентні клітини в досліді *in vitro*.

Матеріали та методи дослідження

МК утворюється при взаємодії одноланцюгової дріжджової РНК з 2,7-біс[2-(диетиламіно-етокси)-флуорен]-9-он дигідрохлоридом (тилороном). Як високомолекулярний компонент МК використовували комерційний препарат дріжджової РНК (рибосомальна фракція) (НПО «Біохімреактив», Олайна, Латвія), який додатково очищували потрійною фенольною депротейнізацією з подальшим осадженням етанолом. Низькомолекулярним компонентом МК слугував препарат тилорону («Sigma», США).

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 α/β -ІФН рибонуклеїнової природи – ридостин (дволанцюгова РНК дріжджів *Saccharomyces cerevisiae*, НПО «Вектор», Росія).

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 [10] та інтенсивністю їх кисеньзалежного метаболізму в НСТ-тесті за методом [11]. За цитохімічним коефіцієнтом (ЦХК) проводили оцінку активності пероксидазних систем.

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 [12].

Визначення розеткоутворювальних клітин (РУК) проводили методом розеткоутворення з частинками, що вкриті моноклональними антитілами [13].

Результати та їх обговорення

Важливим критерієм оцінки біологічного впливу будь-якого агенту на імунну систему організму є його прояви на рівні клітини. Тому дослідження імуномодуючих властивостей МК проводили в умовах *in vitro*, використовуючи лімфоїдні клітини крові здорових донорів: лімфоцити (Лф), нейтрофільні гранулоцити (НГ), моноцити (Мн), а також природні кілерні клітини (ПК-клітини).

Для нас виявилося цікавим дослідити функціональну активність клітин фагоцитів як НГ, так і Мн під дією різних доз МК, а також відомих інтерферогенів, оскільки вплив потенційного імуномодулятора на фагоцитарну активність клітин крові є одним з необхідних тестів на наявність імуномодулюючого ефекту [14].

З метою дослідження функціональної активності клітин фагоцитів на першому етапі проводили вивчення поглинальної здатності НГ за допомогою латексного тесту.

На рисунку 1 представлені дані щодо впливу МК на фагоцитоз НГ, виражені в зміні величин проценту фагоцитів (ПФ) (відсотку клітин, які захопили часточки латексу) (рис. 1а) і фагоцитарного числа (ФЧ) (середньої кількості частинок, яку поглинула одна фагоцитувальна клітина) (рис. 1б) у порівнянні з аналогічними параметрами для окремо взятих компонентів МК, а також стандартного індуктору ІФН І типу – ридостину.

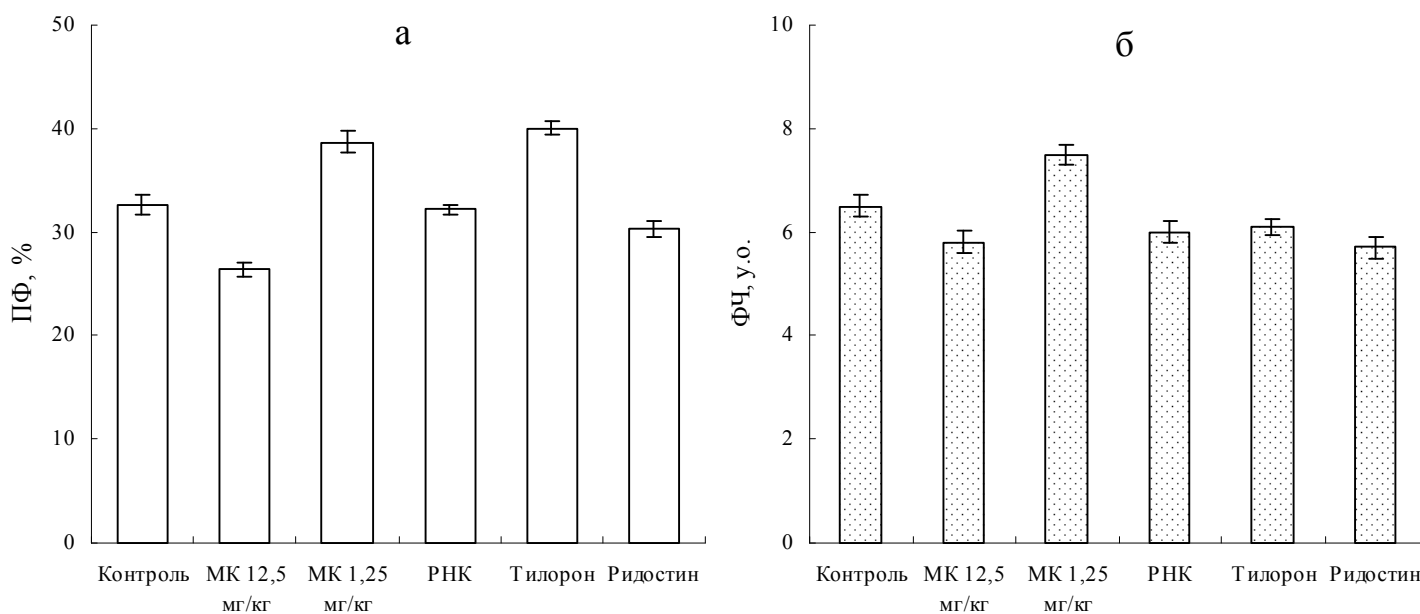


Рис. 1. Вплив МК та препаратів порівняння на показники фагоцитозу НГ

Як видно з рисунку 1, ні один з препаратів в досліджуваних концентраціях практично не впливав на рівень ПФ досліджуваних клітин.

МК в концентрації 12,5 мг/мл дещо знижував як показник ПФ, так і ФЧ (26,4% проти 32,6% та 5,8 у.о. проти 6,5 у.о. відповідно). МК в концентрації 1,25 мг/мл незначно підвищував як показник ПФ, так і ФЧ (38,7% проти 32,6% та 7,5 у.о. проти 6,5 у.о. відповідно). РНК та ридостин також незначно знижували обидва показники. Виключення складає лише тилорон, який у досліджуваній концентрації потенційно міг впливати на процес фагоцитозу внаслідок своєї дії безпосередньо на клітинні нуклеїнові кислоти.

Таким чином, при нормальній фагоцитарній активності клітин ($32,6 \pm 0,9\%$) НГ, величини ПФ до і після інкубації клітин з досліджуваними препаратами мало відрізнялися один від одного. Щодо ФЧ, то цей показник залишався практично також практично незмінним.

Другим етапом цих досліджень було вивчення перетравлювальної здатності НГ у НСТ-тесті. Результати про зміну активності кисеньзалежного метаболізму після взаємодії НГ з досліджуваними препаратами та препаратами порівняння наведені на рисунку 2. Визначення кисеньзалежного метаболізму НГ здійснювали за відсотком НСТ-позитивних клітин (рис. 2.а.) та цитохімічним коефіцієнтом (ЦХК) (рис. 2.б.).

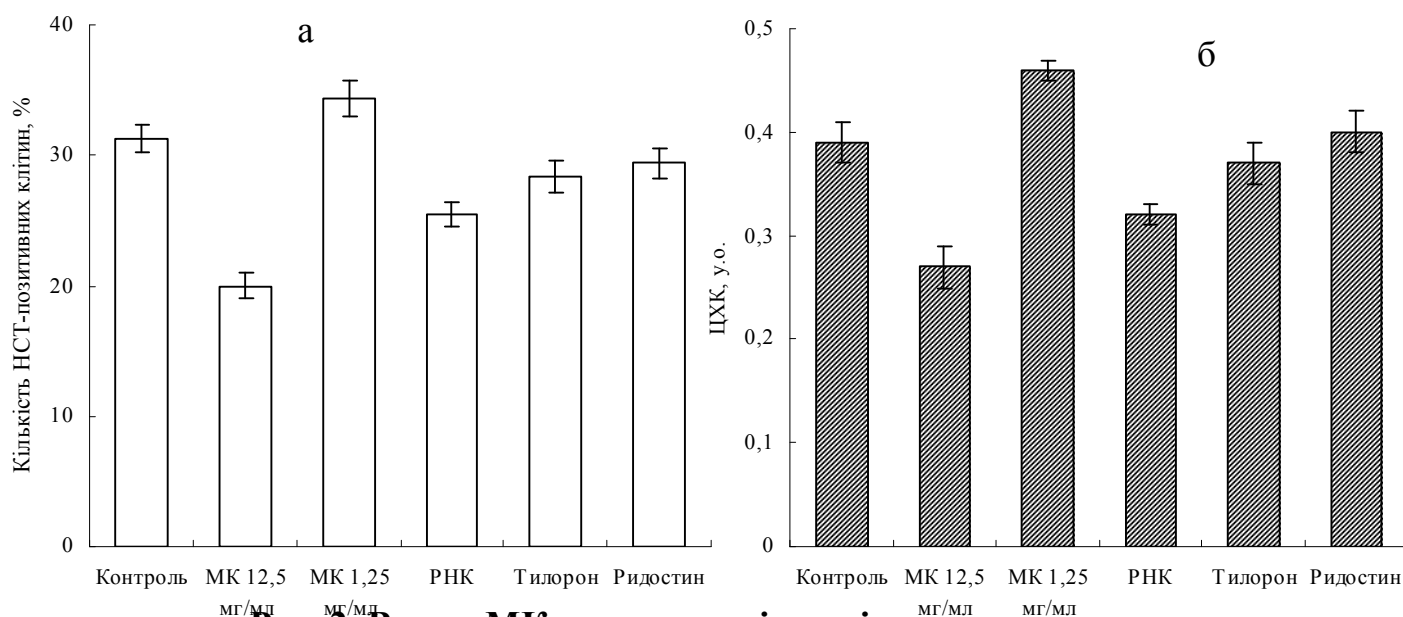


Рис. 2. Вплив МК та препаратів порівняння на показники спонтанного НСТ-тесту НГ

Дані цього тесту свідчать, що всі досліджувані препарати також достовірно не впливали як на кількість НСТ-позитивних клітин, так і на їх функціональну активність (рис. 2). Виключення складає лише МК в концентрації 12,5 мг/мл, який достовірно пригнічував як кількість НСТ-позитивних клітин на 36%, так і ЦХК на 31%. Це можливо свідчить про те, що висока концентрація МК негативно впливає як на функціональну активність НГ, так і на активність кисеньзалежного метаболізму НГ.

Аналогічні дослідження впливу МК на функціональну активність фагоцитуючих клітин проводили на моделі Мн. Спочатку також проводили вивчення поглинальної здатності Мц за допомогою латексного тесту (рис. 3).

Дані, наведені на рисунку 3а визначення поглинальної активності Мц до і після взаємодії з досліджуваними препаратами свідчать, що МК та ридостин помітно збільшували фагоцитарну активність Мн, як поглинальну, так і перетравлюючу, на відміну від НГ.

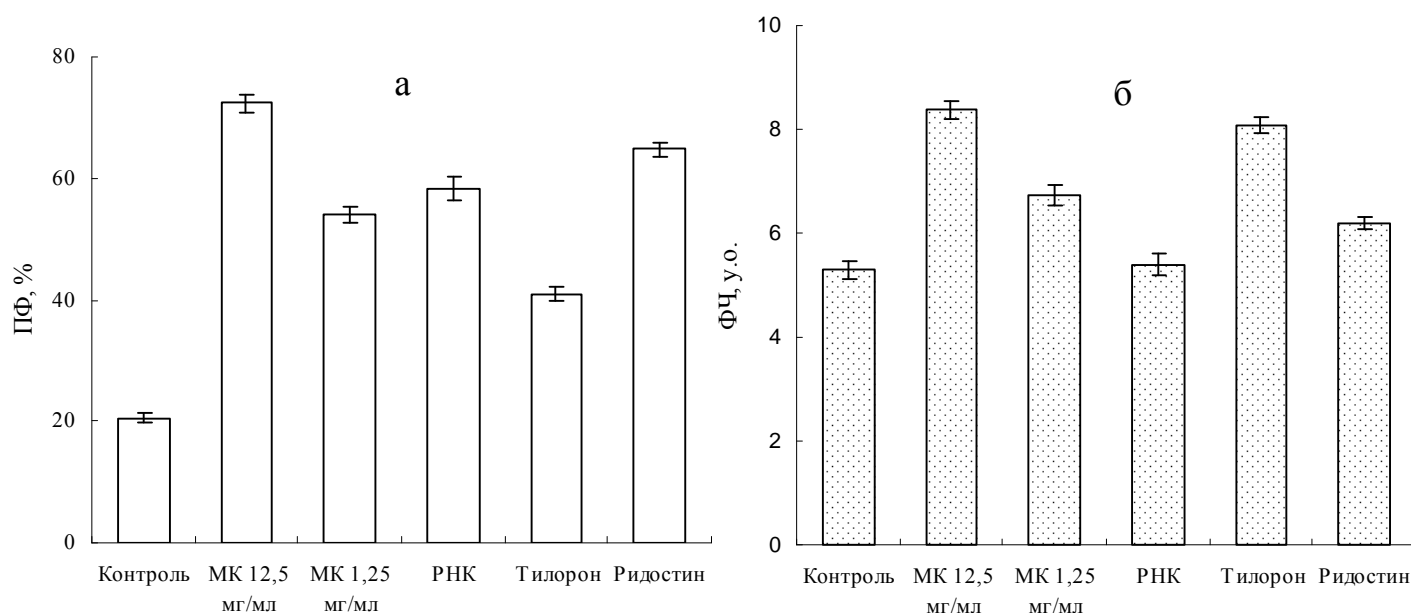


Рис. 3. Вплив МК та препаратів порівняння на показники фагоцитозу Мц

Так, МК в концентрації 12,5 мг/мл підвищував ПФ у 3,5 рази (рис. 3а) та ФЧ майже в 2 рази (рис. 3б). 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 фагоцитувальна клітина (ФЧ) збільшується у 1,5 рази.

Таким чином, клітини Мц виявилися більш чутливими до активації досліджуваними препаратами. В цьому випадку, виходячи з отриманих результатів, ми можемо припустити, що такий стимулюючий вплив на клітини Мц справляв МК саме за рахунок наявності в його складі РНК.

Визначення кисеньзалежного метаболізму Мц здійснювали за відсотком НСТ-позитивних клітин та цитохімічним коефіцієнтом (ЦХК). Результати, які відображають характер впливу досліджуваних препаратів на активність кисеньзалежного метаболізму Мц, наведені на рисунку 4. Їх аналіз показав, 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. Останнє може свідчити про те, що МК, внаслідок своїх специфічних фізико-хімічних властивостей, може відігравати роль активатора певних окисно-відновних реакцій в клітинах Мн.

Таким чином, в досліджах *in vitro* показаний імуномодулюючий вплив МК на функціональну активність НГ та Мц периферичної крові здорових донорів. Наші дослідження також показали, що МК має виразний вплив на фізіологію вказаних фагоцитувальних клітин, викликаючи інтенсифікацію функціонування моноцитарно-макрофагальної системи. Оскільки перекис водню і кисневі радикали є найбільш ефективною бактерицидною системою фагоцитів, це дає підставу розглядати МК як досить дієвий

чинник підвищення (Мц) та пригнічення (НГ) активності фагоцитарної ланки імунітету.

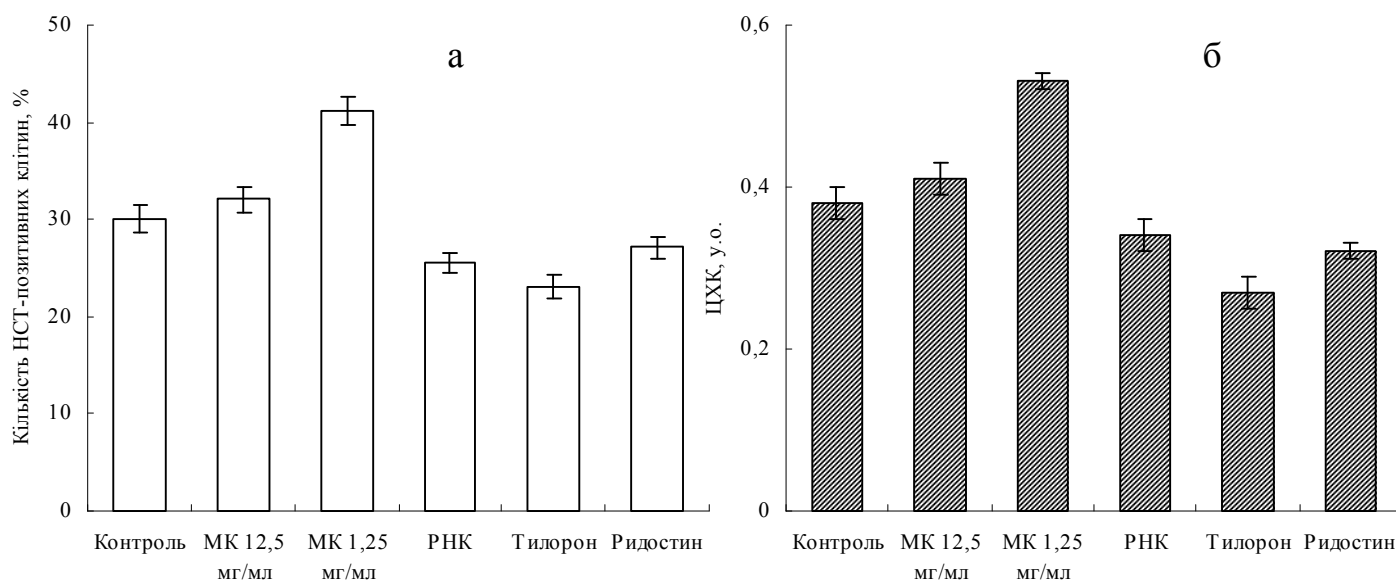


Рис. 4. Вплив МК та препаратів порівняння на показники спонтанного НСТ-тесту Мц

Однією з важливих характеристик, що проявляються при дії потенційних імуномодуляторів на неспецифічний імунітет, є цитотоксична активність ПК-клітин. З огляду на це досліджували вплив МК на ПК-клітини і ймовірну зміну їх цитотоксичної та антитілозалежної цитотоксичності, що відбувається при цьому. При цьому визначали такі параметри, як спонтанну цитотоксичність (СЦ) та антитілозалежну клітинну цитотоксичність (АЗКЦ) ПК-клітин під дією МК. Результати даних досліджень наведені на рисунку 5.

Як видно з наведених даних (рис. 5), цитотоксична активність ПК-клітин та клітин, що відповідають за антитілозалежну цитотоксичну активність, пропорційно збільшується зі збільшенням концентрації МК. Так, при малих концентраціях МК спостерігається зниження активності ПК-клітин у 5 разів, але вже при концентрації МК 1,25 мг/мл величини СЦ та АЗКЦ набувають значень контролю, а при концентрації 12,5 мг/мл відбувається збільшення активності ПК-клітин у 2 рази.

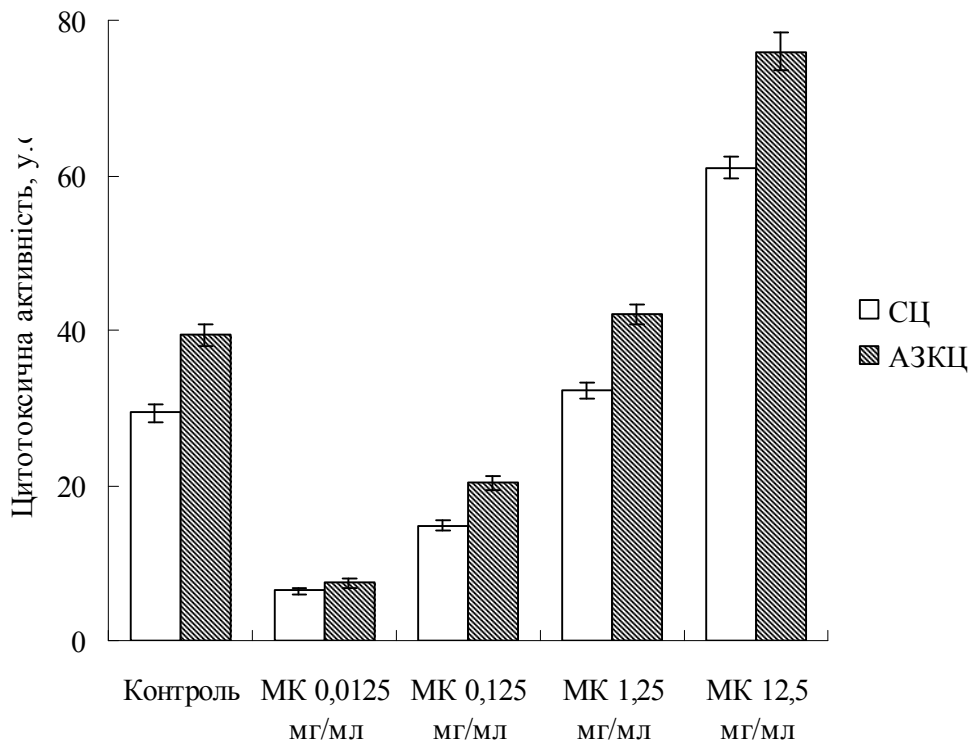


Рис. 5. Вплив МК на спонтанну та антигілозалежну цитотоксичність ПК-клітин

Так як відомо, що проявленню активності ПКК в умовах макроорганізму зазвичай передує інфікування вірусами, формування запального та пухлиноутворювального процесу, а в умовах експерименту – введення інтерферонів та їх індукторів (і, зокрема, дл-РНК), активація ПКК, яка відбувається при цьому, обумовлена продукцією ІФН- α/β , а також інтерлейкіну-12, який теж продукується при цьому, і здатний збільшувати активність ПКК майже у 100 разів [15]. Тому наші експериментальні дані збігаються з даними літератури, оскільки відомо, що індуктори ІФН I типу, такі як роу І:С та тилорон підвищують клітинну активність НК клітин та відповіді на клітини-мішені шляхом індукції перфोरину та TRAIL-залежної цитотоксичності [16], але без зміни специфічності цільових клітин [17, 18].

Одним з актуальних методів оцінки впливу потенційного імуномодулятора на стан клітинного імунітету є визначення співвідношення субпопуляцій Лф периферичної крові та фенотипових

маркерів, які характеризують зміну функціонального стану клітини. Наявність МКАТ практично до всіх рецепторів, які забезпечують диференціацію та дозрівання Лф, дозволяє за їх допомогою розкрити механізми різних патологічних станів організму людини. Виходячи з цього, логічним вважалось дослідження впливу 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). Для визначення щільності рецепторів на В-Лф використовували еритроцити, вкриті МКАТ проти CD22+ після обробки Лф різним концентраціями МК. Результати цих досліджень наведені на рисунку 6.

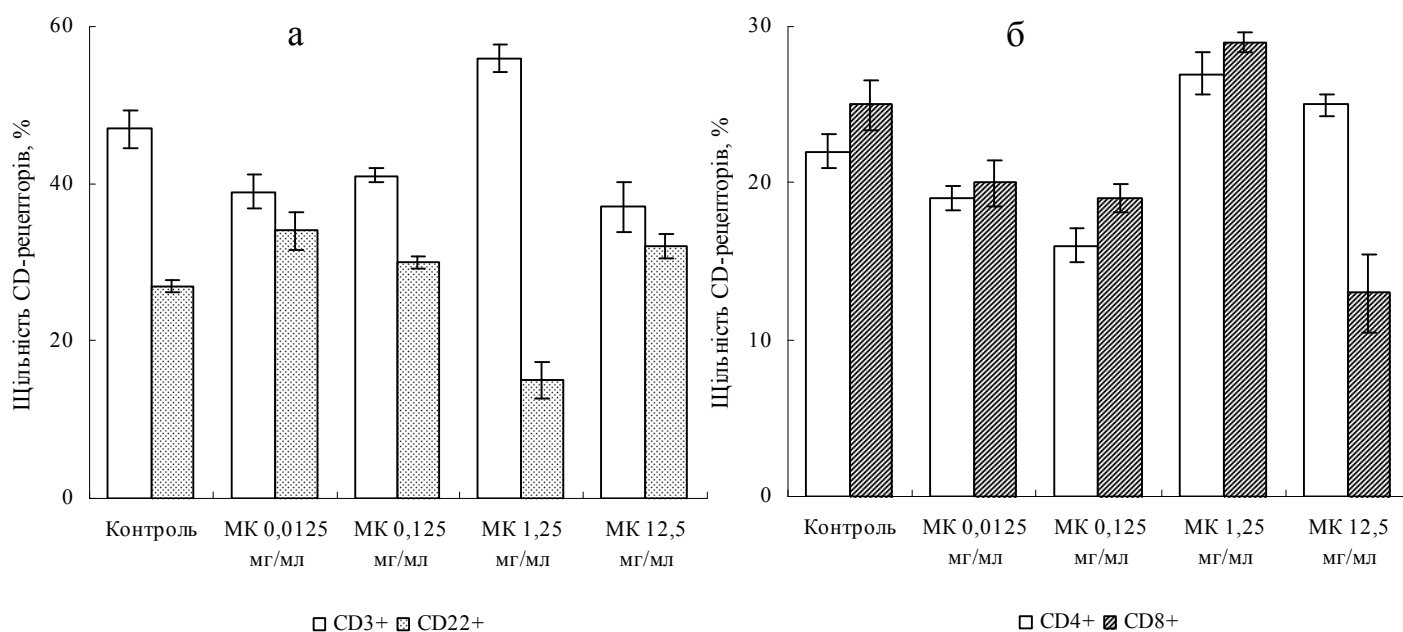


Рис. 6. Вплив МК на експресію CD-рецепторів лімфоцитами крові

При дослідженні впливу МК на клітинні реакції нами був виявлений дозозалежний ефект впливу МК на реакції Т-розеткоутворення. Як видно з рисунку 6а, при додаванні МК в концентрації 0,0125, 0,125 та 12,5 мг/мл кількість рецепторів до CD3+ клітин залишалась приблизно на одному

рівні, незначно меншому за контрольний рівень клітин (відповідно на 17%, 13% та 21%; $p < 0,05$). При інкубації Лф з МК в концентрації 1,25 мг/мл кількість рецепторів до CD3+ клітин збільшилась на 19%. У випадку ж аналізу рецепторів до CD22+ клітин спостерігали незначне достовірне підвищення кількості рецепторів при інкубації Лф з МК у концентраціях 0,0125, 0,125 та 12,5 мг/мл (відповідно на 26%, 11% та 19%). При застосуванні МК в концентрації 1,25 мг/мл кількість рецепторів до CD22+ зменшується на 44%. Це свідчить про те, що МК впливає на розеткоутворювальну здатність як Т-Лф, так і В-Лф, а ефективність експресії рецепторів залежить від концентрації МК.

В зв'язку з тим, що в даному разі підсилюється експресія рецепторів на як на Т- так і на В-Лф, можна припустити, що виявлений нами імуномодуляторний вплив МК на Лф пов'язаний з дією цього комплексу на як на Т- так і на В-ланцюг імунної системи організму. Тому в подальших наших дослідженнях ми мали на меті дослідити субпопуляції Т-Лф, а саме CD4+ (Т-хелперів) та CD8+ (Т-цитотоксичних/ефекторних Лф, які володіють різними функціями.

Виконуючи свою хелперну функцію, CD4+ Лф допомагають, по-перше, В-Лф перетворюватися на антитілопродукувальні плазматичні клітини, CD8+ Лф – на зрілу цитотоксичну Т-клітину, по-друге, макрофагам здійснювати ефекти гіперчутливості сповільненого типу. Зазначені функції Т-Лф-хелперів реалізуються за рахунок того, що вони, в свою чергу поділяються на 2 субпопуляції, які виконують різні хелперні функції за рахунок продукції різних цитокінів. CD8+ Лф реалізують специфічні клітинні реакції імунітету – це основна ефекторна клітина клітинно-опосередкованого імунітету, яка здійснює лізис мішеней, забезпечує генетичну постійність внутрішнього середовища організму.

Результати зміни експресії рецепторів до ЕБ, що вкриті МКАТ до CD4+ та CD8+ після інкубації Лф з розчинами МК різної концентрації наведено на рисунку 6б. В наших дослідах під впливом МК на процес

розеткоутворення субпопуляції Т-Лф відбувається вірогідне зменшення субпопуляції CD4+ при обробленні клітин низькими концентраціями МК 0,0125 та 0,125 мг/мл (на 14% та 27%, відповідно; $P < 0,05$) та збільшення їх кількості на 23% та 14% відповідно при більш високих концентраціях 1,25 та 12,5 мг/мл ($P < 0,05$).

При визначенні CD8+ (Т-цитотоксичних/ефекторних Лф) відмічено пригнічуючий вплив МК при його застосуванні в малих концентраціях (0,0125 мг/мл та 0,125 мг/мл) на 20% та 24%, а при концентрації 12,5 мг/мл навіть на 48% ($P < 0,05$). Лише при обробленні Лф МК в концентрації 1,25 мг/мл спостерігається збільшення експресії рецепторів до CD8+ Лф на 16% ($P < 0,05$). Імунорегуляторний індекс при цьому залишається в межах норми від 0,9 до 2,0.

Отже, МК мав виразний достовірний вплив на експресію рецепторів як до CD4+ так і CD8+ Лф, а ефективність його застосування залежала від концентрації.

Підсумовуючи одержані результати, можна відзначити, що доведено безпосередній вплив МК на клітини фагоцити та Лф. Це підтверджується збільшенням кількості фагоцитувальних клітин моноцитарно-макрофагальної популяції, підвищенням цитотоксичної активності ПК-клітин та клітин, що відповідають за антитілозалежну цитотоксичну активність та зміненням експресії рецепторів на Лф під впливом різних концентрацій МК. Отже, МК виявляє *in vitro* імуномодулюючі властивості. Це доводить перспективність подальшого вивчення його ефектів на рівні макроорганізму.

ЛІТЕРАТУРА:

1. Goodbourn S., Didcock L., Randall R.E. Interferons: Cell signaling, immune modulation, antiviral responses and virus countermeasures // *J. Gen.Virol.* – 2000. – Vol.81, №10. – P. 2341 – 2364.
2. Randall R.E., Goodbourn S. Interferons and viruses: an interplay between induction, signalling, antiviral responses and virus countermeasures // *J.Gen.Virol.* – 2008. – Vol. 89. – P. 1 – 47.
3. Leysen P., Drosten C., Paning M., Charlier N., Paeshuyse J., De Clercq E., Neyts J. Interferons, interferon inducers, and interferon-ribavirin in treatment of flavivirus-induced encephalitis in mice // *Antimicrob. Agents Chemother.* – 2003. – Vol. 47. – P. 777 – 782.
4. Padalko E., Nuyens D., De Palma A., Verbeken E., Aerts J.L., De Clercq E., Carmeliet P., Neyts J. The interferon inducer amplitgen [poly(I)-poly(C₁₂U)] markedly protects mice against coxsackie B3 virus-induced myocarditis // *Antimicrob. Agents Chemother.* – 2004. – Vol. 48. – P. 267 – 274.
5. Хаитов Р.М., Пинегин Б.В. Иммуномодуляторы: механизм действия и клиническое применение // *Иммунол.* – 2003. – № 4. – С. 196 – 203.
6. Mayer G.D., Krueger R.F. Tilorone hydrochloride and related molecules. In D.A. Stringfellow (ed.) *Interferon and interferon inducers: clinical applications.* Marcel Decker, New York, N.Y. – 1980. – P. 187 – 221.
7. Gaforio J.J., Ortega, E., Algarra I., Serrano M.J., Alvarez de Cienfuegos G. NK cells mediate increase of phagocytic activity but not of proinflammatory cytokine (interleukin-6 [IL-6], tumor necrosis factor alpha, and IL-12) production elicited in splenic macrophages by tilorone treatment of mice during acute systemic candidiasis // *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* – 2002. – Vol. 9. – P. 1282 – 1294.

8. Карпов А.В., Жолобак Н.М. Изучение интерферогенных свойств комплексов дрожжевая РНК – тилорон в культуре клеток // Антибиотики и химиотерапия. – 1995. – Т.40, № 5. – С. 20 – 23.
9. Ortega E., Algarra I., Serrano M.J., de Pablo M.A., Alvarez de Cienfuegos G., Gaforio J.J. Enhanced resistance to experimental systemic candidiasis in tilorone-treated mice // FEMS Immunol. Med. Microbiol. – 2000. – Vol. 28. – P. 283 – 289.
10. Унифицированные иммунологические методы обследования больных на стационарном и амбулаторном этапах лечения: Метод. рекомендации / Киевский НИИ фтизиатрии и пульмонологии. – К., 1988. – 18 с.
11. Нагоев Б.С. Модификация цитохимического метода восстановления нитросинего тетразолия // Лаб. дело. – 1986. – № 8. – С. 7 – 11.
12. Круглова И.Ф. Естественные киллеры и методы их исследования Лабораторная диагностика. –1998. – № 2 (4). – С. 32 – 35.
13. Новиков Д.К., Новиков П.Д. Метод определения Т- и В-лимфоцитов диагностикумами на основе моноклональных антител // Иммунол. – 2000. – № 2. – С. 31 – 33.
14. Доклінічні дослідження лікарських засобів: Метод. рекомендації / За ред. О.В. Стефанова. Вивчення імунотоксичної дії лікарських засобів. – К.: МОЗ України, 2001. – С. 102 – 113.
15. Ярилин АА. Система цитокинов и принципы ее функционирования в норме и при патологии // Иммунол. – 1997. – № 5. – С. 7 – 14.
16. Sato K., Hida S., Takayanagi H. Antiviral response by natural killer cells through TRAIL gene induction by IFN-alpha/beta // Eur. J. Immunol. – 2001. – Vol. 31. – P. 3138 – 3146.
17. Salcedo M., Andersson M., Lemieux S., Van Kaer L., Chambers B.J., Ljunggren H.C. Fine tuning of natural killer cell specificity and

maintenance in MHC class I-deficient mice // Eur. J. Immunol. – 1998. – Vol. 28 – P. 1315 – 1321.

18. Fernandez N.C., Treiner E., Vance R.E., Jamieson A.M., Lemieux S., Raulet D.H. A subset of natural killer cells achieves self-tolerance without expressing inhibitory receptors specific for self-MHC molecules // Blood – 2005. – Vol. 105. – P. 4416 – 4423.