

УДК: 615.371: 578.832.1

ПОРІВНЯЛЬНЕ ДОСЛІДЖЕННЯ АКТИВНОСТІ СТИМУЛЯТОРІВ ІМУННОЇ ВІДПОВІДІ В ЕКСПЕРИМЕНТАХ IN VITRO

О.А. Романова, А.В. Мартинов, Н.І. Ігумнова, Т.А. Сидоренко, В.І. Чернявський,
М.В. Смілянська, С.Д. Перемот

Інститут мікробіології і імунології імені І.І. Мечникова АМН України, м. Харків, Україна

РЕЗЮМЕ

З метою пошуку ад'ювантної складової пероральної антисиньогнійної спліт-вакцини проведено порівняння імуностимулюючої активності тималіну, його ацильованої форми та неспецифічного препарату рослинного походження – глюкокорибіну в досліджах in vitro з використанням інтегральних реакцій клітинного імунітету людини і тварин. Найвищий потенціуючий ефект було відмічено у похідного чорної смородини, тоді як у ацильованої форми тималіну він виявився найслабшим.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: імуностимулятори, лімфоцити, клітинний імунітет

Поширеність ускладнень лікарняних інфекцій, незважаючи на наявність нових антисептичних засобів і постійне удосконалення протимікробних препаратів, з новою гостротою становить питання специфічної профілактики шляхом вакцинації. Причиною сучасних гнійно-септичних хірургічних ускладнень найчастіше є грам-негативні бактерії, серед яких переважає (27-39%) *P.aeruginosa* [1]. Складність подолання інфекцій, викликаних синьогнійною паличкою, обумовлена її множинною антибіотикорезистентністю і особливостями перебігу інфекційного процесу. Тому створення дієвої вакци-

ни для профілактики синьогнійної інфекції на сьогоднішній день мало б вирішальне значення для упередження гнійно-септичних ускладнень після хірургічних або діагностичних інвазивних втручань.

В рамках науково-дослідної роботи Інституту «Ацильовані похідні білків та полісахаридів антигену синьогнійної палички, розробка на їх основі вакцини» (№ держреєстрації 0106U003265) в лабораторії імунореабілітології розробляється антисиньогнійна спліт-вакцина. Метою даного дослідження було порівняльне вивчення імуностимулюючих можливостей ряду препаратів специфічної та неспецифічної дії (тималіну [2], ацильованого тималіну, синтезованого за методом [3], та глюкокорибіну – препарату чорної смородини [4]) як потенційних складових антисиньогнійної вакцини з ад'ювантними властивостями.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ

В експериментах in vitro, що відображають інтегральні реакції клітинного імунітету, були використані тимоцити щурів-самців

лінії Wistar та лімфоцити периферичної крові здорових донорів-людей.

Оцінка спонтанної проліферації тимоцитів щурів

Для отримання клітин тимусу тварин морталізували декапітацією під ефірним наркозом, готували в стерильних умовах на льоду суспензію тимоцитів. Вилучений тимус гомогенізували, отриману клітинну суспензію фільтрували через капроновий фільтр, тричі відмивали у повному культуральному середовищі. Для проведення культивування використовували суспензію з концентрацією 5×10^6 кл/мл. Досліджувані препарати додавали до клітинної культури в кількості: тималін та ацильований тималін – по 280×10^{-7} мг/мл, глюкокорибін – $104,5 \times 10^{-5}$ г/мл (в перерахунку на альбумін за методом Флореса). Тимоцити інкубували протягом 3 діб у вологій камері, в атмосфері, збагаченій CO_2 , в повному культуральному середовищі з додаванням і без додавання препаратів. Після закінчення культивування з клітинних суспензій готували препарати-мазки для морфологічного дослідження. В препаратах, пофарбованих за Романовським-Гімза, визначали відсоток лімфобластів по відношенню до загальної кількості лімфоїдних клітин, підраховуючи не менше 250 лімфоїдних клітин на препарат.

Оцінка експресії рецепторів на Т-лімфоцитах людини і тварин

Для фенотипування дозрілих Т-лімфоцитів у периферичній крові донорів використо-

ували МКАТ $CD3^+$, помічені ФІТЦ. Мононуклеари периферичної крові виділяли за допомогою центрифугування у градієнті густини фікола-верографіна при $d = 1,077$. Перед фенотипуванням зразки гепаринізованої периферичної крові інкубували з досліджуваними препаратами протягом 1 години. Ре-

акцію оцінювали на люмінісцентному мікроскопі. Підрахунок здійснювали на 100 лімфоцитів, результат виражали у відсотку клітин, що виявляли люмінісценцію.

Експресію рецепторів до еритроцитів барана на тимоцитах шурів в присутності імуностимуляторів визначали за тестом Е-рокеткоутворення [5]. Перед виконанням реакції виділені тимоцити інкубували з препаратами протягом 1 години. Підраховуючи 200 лімфоцитів, Е-рокеткоутворюючі клітини (Е-РУК) визначали за приєднанням не менше трьох еритроцитів. Результат виражали у відсотку Е-РУК по відношенню до загально-го числа підрахованих лімфоцитів.

В експериментах було досліджено 11 зразків периферичної крові здорових донорів і 13 тимусів шурів.

При статистичному аналізі результатів використовували параметричні методи. Визначали середнє арифметичне (\bar{X}) та помилку середнього арифметичного ($s\bar{X}$). Вірогідність різниці між показниками різних груп оцінювали за критерієм Стюдента і вважали значущою при $p < 0,05$.

казало спроможність цього препарату до підвищення активації експресії рецептору дозілих Т-лімфоцитів на 37% у порівнянні із зразками, в які препарат не додавався. При-

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ОБГОВОРЕННЯ

За оцінки здатності тималіну, ацильованого тималіну та глюкокортибину викликати проліферацію лімфоцитів встановлено, що всі препарати мали здатність достовірно збільшувати мітотичну активність, проте найвищим потенціалом серед них відрізнявся препарат чорної смородини, який майже вдвічі посилював РБТ (табл.). Характерно, що дана речовина спричинювала активацію бластогенезу на 35% вищу, ніж класичний препарат корекції функцій вилочкової залози і Т-системи імунітету – тималін. Що стосується мітогенної дії отриманої шляхом ацилювання нової форми тималіну, вона виявилась найслабшою (~37% перевищення спонтанної проліферації).

Вивчення впливу досліджуваних препаратів на Е-рокеткоутворюючу здатність тимоцитів продемонструвало її підвищення на 35,4% та 39,7% у випадках застосування тималіну і глюкокортибину відповідно, тоді як ацильований тималін не викликав достовірних змін цієї функції клітин. Застосування глюкокортибину в реакції імунофенотипування CD3⁺-лімфоцитів людської крові також по-

сутність у зразках периферичної крові Тималіну або його ацильованої форми достовірних змін експресії CD3⁺ не виявила.

Таблиця

Вплив препаратів-імуностимуляторів на реакції клітинного імунітету *in vitro* ($\bar{X} \pm s\bar{X}$)

| Препарати | Проліферація лімфоцитів, % | Експресія рецепторів до ЕБ, % | Експресія рецепторів CD3 ⁺ , % |
|----------------|----------------------------|-------------------------------|---|
| Без препаратів | 26,0±2,4 | 37,5±2,8 | 49,0±4,0 |
| Тималін | 42,5±3,7* | 50,8±4,3* | 56,1±6,7 |
| Ац. тималін | 35,8±2,9* | 41,2±4,3 | 51,3±5,2 |
| Глюкокортибін | 51,6±4,5* | 52,4±3,9* | 67,3±5,8* |

*- достовірність відмінностей у порівнянні з контролем, $p < 0,05$.

Таким чином, в результаті експериментів виявилось, що досліджений рослинний препарат неспецифічної дії має достатньо високий імуностимулятивний потенціал у застосованих тестах *in vitro*, що характеризують функції лімфоцитів. Відомо, що Т-лімфоцити є найважливішим елементом кровотворного мікрооточення [6]. Інтерлейкін-3 (ІЛ-3), що продукується активованими Т-лімфоцитами, належить до найбільш ранньодіючих гемопоетинів, які стимулюють процеси проліферації та диференціювання ранніх кровотворних попередників [7]. Окрім цього фактора, Т-лімфоцити також продукують ІЛ-6, ІЛ-7, ГМ-КСФ – цитокіни, що справляють стимулюючий вплив на гемопоез. Через активацію макрофагів та ретикулоцитів, що формують мікрооточення, Т-лімфоцити здатні опосередковано контролювати і регулюва-

ти міело- та лімфопоез у кровотворній тканині [8, 9]. Отже, вплив на Т-компаратмент імунітету є надважливим як для стимуляції В-ланки, тобто спрямування проліферації лімфоцитів в бік формування дозрілих В-клітин, так і на активацію кровотворення взагалі, що має неабияке значення для корекції імунної відповіді у поширених випадках наявності імунодефіциту. З цього боку застосування у вакцинації проти синьогнійної інфекції, препарату, стимулюючого клітинну ланку імунітету, є вельми доцільним. Можна припустити, що таким препаратом, після додаткового тестування *in vivo* та *in vitro*, може виявитись глюкокортибін.

ВИСНОВКИ

1. Неспецифічний препарат рослинного походження глюкокортибін має виражений

- ефект стимуляції клітинних імунних реакцій.
2. Отримана шляхом ацилювання нова форма тималіну продемонструвала найнижчу імуностимулюючу здатність

порівняно з тималіном та глюкорибіном, що виключає можливість її потенційного застосування у складі антисиньогнійної вакцини.

ЛІТЕРАТУРА

1. Романова О.А., Смілянська М.В., Городницька Н.І., та ін. // *Аннали Мечниківського Інституту*. - 2006. - №3. - С.4-18.
2. Дранник Г.М., Гриневич Ю.Я., Дизик Г.М. Імунотропні препарати. -К.:Здоров'я. - 1994. - С. 61, 269.
3. Martynov A.V., Smelyanskaya M.V. // *J. of Interf. & Cytokine res.* - 2005. - Vol.25. - №7. - P. 414-417.
4. Савченко В.Н., Яблчанский Н.И., Хворостинка В.Н., Сокол К.М. Лекарственные растения и фитотерапия. -Харьков:Гриф. - 2004. - С. 11, 176.
5. Передерий В.Г., Земсков А.М., Бычкова Н.Г., Земсков В.М. Иммунный статус, принципы его оценки и коррекции иммунных нарушений. -К.:Здоров'я. - 1995. - 210 с.
6. Фриденштейн А.Я., Лурия Е.А. Клеточные основы кроветворного микроокружения. -М.:Наука. - 1980. - 244 с.
7. Дыгай А.М., Богдашин И.В., Шерстобоев Е.Ю., и др. // *Иммунология*. - 1991. - № 2. - С. 20-26.
8. Дыгай А.М., Шахов В.П. Роль межклеточных взаимодействий в регуляции гемопоэза. - Томск. 1989. - 165 с.
9. Натан Д.Г., Зифф К.А. // *Гематол. и трансфузиол.* - 1994. - Т. 39. - № 2. - С. 3-10.

СРАВНИТЕЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ АКТИВНОСТИ СТИМУЛЯТОРОВ ИММУННОГО ОТВЕТА В ЭКСПЕРИМЕНТАХ IN VITRO

*Е.А. Романова, А.В. Мартынов, Н.И. Игумнова, Т.А. Сидоренко, В.И. Чернявский,
М.В. Смельянская, С.Д. Перемот*

Институт микробиологии и иммунологии имени И.И. Мечникова АМН Украины г. Харьков,
Украина

РЕЗЮМЕ

С целью поиска адьювантной составляющей антисинегнойной сплит-вакцины проведено сравнение иммуностимулирующей активности тималина, его ацилированной формы и неспецифического препарата растительного происхождения – глюкорибина в экспериментах *in vitro* с использованием интегральных реакций клеточного иммунитета человека и животных. Наиболее высокий потенцирующий эффект был отмечен у производного черной смородины, тогда как у ацилированной формы тималина он оказался наиболее слабым.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: иммуностимуляторы, лимфоциты, клеточный иммунитет

COMPARATIVE INVESTIGATION OF IMMUNOPOTENTIATION DRUGS AKTIVITY IN VITRO

*Е.А. Romanova, A.V. Martynov, N.I. Igumnova, T.A. Sydorenko, V.I. Chernyavsky,
M.V. Smelyanskaya, S.D. Peremot*

I.I. Mechnykov Institute of Microbiology and Immunology of the Academy of Medical Science
of Ukraine, Kharkiv

SUMMARY

As ajuvant components of pseudomonas split vaccine were investigated in immunotropic properties of same substances: timaline, it's acylated derivative and vegetable proteoglican glucoribin from *Ribes Nigrum*. In the study were used in human's and animal cell immunologic reactions.

In the results was established high immunotropic effect in glucoribine, but in timaline and it's acylated derivative such effect was minimal.

KEY WORDS: immunopotentiating drugs, lymphocytes, cell immunity