

НАЦІОНАЛЬНИЙ МЕДИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
ІМ.О.О.БОГОМОЛЦЯ

ФЕСЕНКОВА ВАЛЕНТИНА ЙОСИПІВНА

УДК 615.36:616-006-08

ВПЛИВ ПРЕПАРАТУ ЕРБІСОЛ НА ФУНКЦІОНАЛЬНУ АКТИВНІСТЬ
ІМУНОКОМПЕТЕНТНИХ КЛІТИН

03.00.09 - імунологія (біологічні науки)

АВТОРЕФЕРАТ

дисертації на здобуття наукового ступеня
кандидата біологічних наук

КИЇВ - 2003

Дисертацією є рукопис.

Робота виконана в Інституті урології АМН України, Міжвідомчому республіканському науково-дослідному центрі клінічної імунології.

Науковий керівник: доктор медичних наук Дріяńska Вікторія Євгенівна, Інститут нефрології АМН України, заступник директора з наукової роботи, завідувача лабораторією імунології.

Офіційні опоненти: доктор біологічних наук Бичкова Ніна Григорівна, Національний медичний університет ім.О.О.Богомольця, головний науковий співробітник відділу експериментальної та клінічної імунології НДЛЦ;

доктор медичних наук, професор
Чумак Анатолій Андрійович, Науковий центр радіаційної медицини АМН України, відділ клінічної імунології, завідувач лабораторією молекулярної біології.

Провідна установа: Інститут фізіатрії та пульмонології ім. Ф.Г.Яновського АМН України, Київ

Захист дисертації відбудеться 29.01.2004 року о 16-30 год. на засіданні спеціалізованої вченої ради Д 26.003.02 при Національній медичній університет ім. О.О.Богомольця, МОЗ України (01023, м.Київ, вул.Шовковична, 39/1, Центральна міська лікарня, корпус 2).

З дисертацією можна ознайомитись у бібліотеці Національного медичного університету ім.О.О.Богомольця (м.Київ, вул.. Зоологічна, 1).

Автореферат розісланий 29.10.2003 року

Вчений секретар
Спеціалізованої вченої ради,
доктор медичних наук
С.Г.Свирид

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

Актуальність теми: Успіхи фундаментальної та прикладної імунології продемонстрували, що функції імунної системи можуть суттєво змінюватися в сторону підсилення або пригнічення під дією різних ендогенних та екзогенних факторів. Як наслідок, з'явився новий клас фармакологічних засобів - імунотропні препарати: синтетичні, біотехнологічні або природні речовини, здатні впливати на різні ланки імунної системи і змінювати силу, характер та напрямок імунних реакцій, впливаючи на процеси міграції або взаємодії клітин або їх продуктів [Драннік Г.М., 1999].

Незважаючи на інтенсивні пошуки нових імунотропних засобів, кількість тих, що знайшли широке використання в клінічній практиці, не задовольняє спеціалістів. Проблема в тому, що необхідні комплексні рішення ряду задач, що включають: розробку, створення та вивчення тонких механізмів дії та напрямків впливу нових препаратів; визначення показань та протипоказань до використання з врахуванням побічних негативних реакцій; дослідження спектру імунопатологічних станів, що вказують на доцільність використання саме цього препарату; розробка методології найбільш ефективної схеми лікування [Кетлінський С.А. та співавт., 1992].

Актуальними і перспективними задачами можна вважати розробку лікарських препаратів, яким притаманні властивості імунотропних для використання з метою імунотерапії та імунореабілітації. Одним з таких засобів є препарат Ербісол та його похідні. Ербісол - представник нового класу ендогенних регенеративних біологічних імуномодулюючих засобів. Препарат отриманий з ембріональної тканини великої рогатої худоби і містить в своєму складі комплекс природних небілкових низькомолекулярних органічних сполук негормонального походження. Це розчин продуктів гідролізу компонентів клітинних мембран на стадії першої половини вагітності [Ніколаєнко О.М., 1998]. Останнім часом одержано похідні препарату Ербісол - це Супер Ербісол та Екстра Ербісол, функціональні властивості яких до цього часу не вивчено, в зв'язку з чим було поставлено завдання визначити їх вплив на продукцію цитокінів Т-хелперами I типу та Т-хелперами II типу. Препарат Ербісолу та його похідні - Супер Ербісол та Екстра Ербісол відрізняються між собою співвідношенням продуктів гідролізу ембріональної тканини великої рогатої худоби.

Відомо, що дія імуномодуляторів визначається особливостями імунної системи, а саме, взаємозв'язаним та взаємозалежним функціонуванням клітинних елементів, що беруть участь в розвитку імунної відповіді. Це визначає реакцію багатьох форм імуноцитів на

імуномодулятор, навіть діючий на якусь одну популяцію чи субпопуляцію клітин [Манько В.М. и соавт., 2002]. В зв'язку з цим, для клінічного використання важливо визначити ланку імунітету для адресного впливу імунотропних препаратів, тому що інакше використання їх буде неефективним, а може й недоцільним. Особливо це стосується вивчення функціональної активності імунокомпетентних клітин шляхом аналізу продукції цитокінів, які відіграють роль медіаторів, що забезпечують кооперативну міжклітинну взаємодію.

Інтерес до імуностимулюючої терапії зростає в останні роки в зв'язку з проблемами інфекційної патології та онкології. Тривалість інфекційного процесу підвищується, а терапія суттєво ускладнюється при пошкодженні імунної системи та механізмів неспецифічного захисту. Все це можна віднести до такої патології як хронічний хламідіоз, неефективність лікування якого в значному числі випадків робить актуальною проблему використання імуностимулюючої терапії [Аковб'ян В.А., 1997; Базарний В.В. та співавт., 2001; Барабанов Л.Г. та співавт., 1999; Башмакова М.А. и соавт., 2000].

Таким чином, проблема пошуку нових сучасних імунотропних препаратів є дуже актуальною для клінічної медицини. З другого боку, вивчення цитокінів, їх рецепторів та інгібіторів, механізмів фізіологічної регуляції та фармакологічної дії, участі в різних процесах контролювання імунної та кровотворної систем, патофізіології хвороб стало широким та перспективним напрямком знань [Возианов А.Ф., Бутенко А.К., Зак К.П., 1998].

В зв'язку з вищесказаним, визначення механізмів імунотропного впливу Ербісолу на цитокінову ланку імунітету, особливостей порушень цієї ланки у хворих на хронічний сечостатевої хламідіоз та можливостей ефективного використання цього препарату та його похідних з виявленням напрямків дії у пацієнтів є сучасним, доцільним та обґрунтованим.

Зв'язок роботи з науковими планами і програмами. Робота виконана в Інституті урології та нефрології АМН України в рамках тем за планами: Міністерства науки та технологій "Розробка нових технологій імунодіагностики та імунотерапії хворих з урогенітальним хламідіозом з урахуванням імунних механізмів розвитку захворювання та нових методів імунокорекції" (напрямок 02.11-03997); МОЗ і АМН України "Вдосконалити існуючі методи етіотропної імунодіагностики і імунокорекції хворих з урогенітальними інфекціями, що передаються статевим шляхом, з урахуванням механізмів розвитку захворювань (№ держреєстрації 0199U000609)"; "Вивчити генеративну функцію у чоловіків при хламідійній урогенітальній інфекції з метою покращення ефективності діагностики, лікування та профілактики неплідності (№ держреєстрації 0101U000517)".

Мета дослідження: Визначення в експерименті механізмів впливу препарату Ербісолу

(Супер Ербісолу та Екстра Ербісолу) на функціональну активність імунокомпетентних клітин за продукцією цитокінів у здорових осіб та хворих на хронічний сечостатевий хламідіоз для розробки науково-обґрунтованих ефективних рекомендацій щодо використання.

Основні завдання дослідження:

1. Вивчити *in vitro* вплив різних доз Ербісолу та його похідних на функціональну активність макрофагально-фагоцитарної ланки за секрецією ІЛ-1 β та ФНП- α .
2. Вивчити *in vitro* вплив різних доз Ербісолу на функціональний стан Т-хелперів 1 типу (Т-х I) за продукцією ними ІЛ-2 та γ -ІФ.
3. Вивчення *in vitro* впливу різних доз Ербісолу на функціональну активність Т-хелперів II типу (Т-х II) за секрецією ними ІЛ-4 та ІЛ-10.
4. Провести порівняльний аналіз впливу Ербісолу, Супер Ербісолу та Екстра Ербісолу на функціональну активність імунокомпетентних клітин за продукцією ними відповідних медіаторів (ІЛ-1 β , -2, -4, -10, γ -ІФ, ФНП- α).
5. Провести дослідження *in vitro* ефектів Ербісолу та його похідних у хворих на хронічний сечостатевий хламідіоз (ХССХ) за цитокін-продукуючою активністю клітин та визначити можливості їх використання у пацієнтів.

Об'єкт досліджень - імунокомпетентні клітини здорових донорів та хворих на хронічний сечостатевий хламідіоз.

Предмет досліджень - механізми впливу препарату Ербісол на функціональну активність клітин здорових донорів та пацієнтів з ХССХ за продукцією цитокінів (ІЛ-1 β , -2, -4, -10, γ -ІФ, ФНП- α).

Методи досліджень - лабораторні, мікробіологічні, імунологічні - імуноферментні та флуоресцентні.

Наукова новизна одержаних результатів:

- Вперше визначені механізми впливу Ербісолу та його похідних (Супер Ербісол та Екстра Ербісол) на функціональну активність імунокомпетентних клітин здорових донорів. Показано, що Ербісол майже в усіх використаних концентраціях (при максимальному розведенні 1:100) підвищує продукцію ІЛ-1 β і ФНП- α клітинами моноцитарно-макрофагальної ланки та ІЛ-2 і γ -ІФ Т-хелперами I типу.

- Вперше продемонстровано, що Ербісол та його похідні сприяють зниженню функціональної активності Т-хелперів II типу за продукцією таких протизапальних цитокінів

як ІЛ-4 та ІЛ-10. Проведені дослідження дозволяють визначити механізми дії нового вітчизняного препарату Ербісол та його похідних, головними напрямками яких є стимуляція імунної системи за рахунок підвищення цитокін-продукуючої здатності моноцитів/макрофагів та Т-лімфоцитів хелперів І; зниження секреторної активності Т-лімфоцитів хелперів ІІ може бути наслідком зростання активності Т-х І.

Отримані ефекти препарату та його похідних зберігали свою спрямованість в умовах *in vitro* для імунокомпетентних клітин хворих на хронічний сечостатевої хламідіоз, що дозволило вперше продемонструвати механізми дії Ербісолу та його похідних при цій патології.

- Вперше встановлено вплив препарату Ербісол та його похідних (Супер Ербісолу та Екстра Ербісолу) на експресію поверхневих антигенів. Показано, що за умов пригнічення експресії поверхневих антигенів лімфоцитів (CD3+, CD4+, CD3+16+56+, CD3+DR+, CD25+) Ербісол демонструє протекторну дію по відношенню до клітин Т-ланки імунітету (відповідно Т-лімфоцитів, Т-хелперів, Т-кілерів, Т-активних та Т-хелперів з рецепторами до ІЛ-2 (CD25+)) і не відновлює знижені після інкубації *in vitro* параметри експресії антигенів В-клітин.

- Таким чином, вперше показані імуностимулюючі та протекторні ефекти препарату Ербісол та його похідних (Супер Ербісолу та Екстра Ербісолу) на основі дослідження факторів міжклітинної кооперації (продукції медіаторів та експресії рецепторів і антигенів, що визначають фенотипічні особливості); визначені особливості порушень імунітету, які свідчать про необхідність застосування цих препаратів.

Практичне значення роботи: Визначено вплив різних концентрацій Ербісолу та його похідних (Супер Ербісол та Екстра Ербісол) (1:100, 1:500, 1:1000, 1:10000) на функціональну активність імунокомпетентних клітин, показано, що найбільший ефект демонструє розведення 1:100, що аналогічно використанню *in vivo* препарату в дозі 2 мл/кг.

Встановлено виражений позитивний вплив Ербісолу, Супер Ербісолу та Екстра Ербісолу на клітини моноцитарно-макрофагальної системи та Т-хелпери І типу за продукцією ними цитокінів відповідно ФНП- α , ІЛ-1 та ІЛ-2, γ -ІФ з пригнічуючим впливом на Т-хелпери ІІ типу, що продукують ІЛ-4 та ІЛ-10.

Проведено порівняльний аналіз між Ербісолом, Супер Ербісолом та Екстра Ербісолом за їх імуномодулюючими властивостями. Показано, що всі похідні Ербісолу демонструють виражений стимулюючий ефект на моноцитарно-макрофагальну ланку імунітету; Супер Ербісол є найбільш ефективним стимулятором функціональної активності Т-хелперів І з

найбільшим підвищенням продукції медіаторів (ІЛ-2 та γ -ІФ) та експресії рецепторів до ІЛ-2. Відповідно, Супер Ербісол ефективно знижує цитокін-продукуючу можливість Т-хелперів II.

Отримані дані дозволяють вважати доцільним використання Ербісолу та його похідних для захисту та підвищення у разі зниження функціональної активності моноцитарно-макрофагальної та Т-клітинної ланки імунітету.

Продемонстровані нами особливості імунопатогенезу ХССХ, що характеризується зміною функціональної активності Т-хелперів I і II типів зі зниженням продукції цитокінів першими і підвищенням - другими, свідчать про доцільність використання Ербісолу та його похідних у пацієнтів. Визначення нами в експериментах *in vitro* можливостей корекції Ербісолом та його похідними Т-хелперної ланки імунітету у таких хворих дозволять клініцистам розробити алгоритм використання цих препаратів як при ХССХ, так і у разі відповідних порушень імунітету при інших патологіях.

Особистий внесок здобувача: Матеріали, представлені в роботі, є особистим внеском автора у вирішення проблеми впливу імуномодуляторів на імунну систему. Ідеї дисертаційної роботи запропоновані завідуючим лабораторією імунології Інституту урології АМН України доктором медичних наук, професором Дранніком Г.М. та реалізовані за допомогою наукового керівника доктора медичних наук Дріянської В.Є. Автором самостійно проведений патентно-інформаційний пошук та аналіз літературних даних. Самостійно проводилась робота з матеріалами дослідження та лабораторне тестування продукції цитокінів під впливом різних доз препаратів Ербісолу. Самостійно виконані всі етапи роботи з культурами клітин. Самостійно проведений статистичний аналіз та разом з керівником надано оцінку отриманим результатам.

Апробація результатів роботи: основні результати роботи доповідались та обговорювались на 4-й науково-практичній конференції з актуальних питань алергології, клінічної та лабораторної імунології. - Київ, листопад 1999 р.; III Національному Конгресі патофізіологів України. - Одеса, вересень 2000 р.; II Міждисциплінарній науково-практичній конференції "Епідеміологія, імунопатогенез, діагностика та лікування хламідіозу". - Київ, 23-25 квітня 2001 р.; VI Українській науково-практичній конференції з актуальних питань клінічної і лабораторної імунології, алергології та імунореабілітації. - Київ, 29-31 травня 2002 р.

На міжнародних симпозіумах і конгресах: The Annual Meeting of the European Academy of Allergology and Clinical Immunology (Brussels, Belgium, 1999); XIX Congr. of the European

Academy of Allergology and Clinical Immunology (Lisbon, Portugal, 2000); 56 An. Meeting AAAAI (San Diego, California, 2000); “Цитокины. Воспаление. Иммунитет” (Санкт-Петербург, Россия, 23-26 июня 2002 г.).

Публікації: За матеріалами дисертації надруковано 9 наукових праць, серед них статей 7, тез 2, в тому числі у фахових виданнях, рекомендованих ВАК України. Публікації повністю відображують матеріали дисертації.

Структура та обсяг дисертації: Дисертація складається з вступу, огляду літератури, матеріалів та методів дослідження, 3 розділів власних досліджень, обговорення, висновків, списку використаних джерел.

Дисертація викладена на 137 листках машинописного тексту.

До списку літератури входить 238 джерел літератури, з них 154 вітчизняних і 84 іноземних. Дисертація ілюстрована 19 таблицями та 22 рисунками.

ЗМІСТ РОБОТИ

Матеріали та методи дослідження. Проведені дослідження спонтанної та індукованої мітогенами (ФГА, ЛПС) і препаратами Ербісолу (Ербісол, Супер Ербісол, Екстра Ербісол) продукції цитокінів (ІЛ-1, ІЛ-2, ІЛ-4, ІЛ-10, ФНП- α та α -, β -, γ -ІФ) у 15 здорових донорів (6 чоловіків та 9 жінок) дозволили проаналізувати 893 зразки супернатантів.

Продукція цитокінів клітинами хворих з ХССХ, в тому числі індукована препаратами Ербісолу, визначалась за даними 473 зразків супернатантів. Так, спонтанна та індукована продукція ІЛ-1 вивчалась у 44 хворих на ХССХ, з додаванням Ербісолу - у 20 хворих; продукція γ -ІФ - у 44 хворих, з додаванням Ербісолу - у 19 хворих; продукція ІЛ-10 - у 29 хворих, з додаванням Ербісолу - у 19 хворих. Спонтанний та індукований синтез оксиду азоту (NO) вивчався у 15 здорових, 42 хворих, а з додаванням Ербісолу - у 19 хворих. Таким чином, спонтанна та індукована продукція цитокінів і оксиду азоту проаналізована у 396 зразках супернатантів клітин хворих та з додаванням препаратів Ербісолу - в 77 зразках супернатантів пацієнтів. Всього досліджено 1366 зразків супернатантів клітин здорових та хворих на ХССХ. Також проаналізовано 825 показників імунітету 15 здорових донорів при культивуванні клітин за умов додавання Ербісолу, Супер та Екстра Ербісолу.

2.1. Імуноферментний метод дослідження

а) Одержання супернатантів. Виділені на стандартному градієнті фікол -верографіну (1,076-1,078) мононуклеарні клітини периферійної крові відмивали тричі в середовищі RPMI-1640, що містило 10% ембріональної телячої сироватки, 40 мкг/мл гентаміцину, 5×10^{-5} М 2-меркаптоетанолу та 3% L-глутаміну. Клітинну суспензію в концентрації $1,5 \times 10^6$ кл/мл інкубували 24 години в CO_2 -інкубаторі при $t=37^\circ\text{C}$ без стимулюючого агента, в присутності фітогемаглютинину (ФГА) - 50 мкг/мл, ліпополісахариду (ЛПС) -30 мкг/мл та використовували різні розведення Ербісолу та його похідних (Ербісолу, Супер Ербісолу та Екстра Ербісолу) - 1:100, 1:500, 1:1000 та 1:10 000. Розведення 1:100 відповідало разовій дозі препарату 2 мл/кг в перерахунку на кількість клітин лімфоцитарно-моноцитарного ряду в 1 мл культурального середовища (на $1,5 \times 10^6$ кл/мл). По закінченні терміну інкубації клітини осаджували центрифугуванням, збирали супернатанти і зберігали до тестування при $t= -20^\circ\text{C}$.

Вміст цитокінів у супернатантах визначали за допомогою імуноферментного методу. Для визначення вмісту цитокіну використовували тест систему "DIACLON", Франція. Тестування проводили за допомогою імуноферментного методу на приладі Stat Fax 303 Plus.

b) Визначення вмісту цитокіна у супернатантах. До 96-лункових планшет додавали: по 100 мкл стандартів у відповідні лунки для побудови калібрувальної кривої. В інші лунки вносили по 100 мкл супернатанту, що досліджувався. В усі лунки додавали по 50 мкл відповідних антицитокінових антитіл. Планшети інкубували при кімнатній температурі протягом 2 годин, потім лунки 5 разів ретельно промивали буфером і видаляли залишки рідини.

Далі в кожен лунку вносили по 100 мкл кон'югату (стрептавідін-пероксидазу), включаючи “нульову” пробу. Після цього проби інкубували при кімнатній температурі протягом 30 хвилин. Повторювали промивку планшети 5 разів та вносили до всіх лунок по 100 мкл ТМВ-субстрату (хромогенний агент). Після інкубації протягом 12-15 хвилин зупиняли ферментативно-субстратну реакцію, додаючи в кожен лунку по 100 мкл H_2SO_4 . Далі проводили визначення оптичної щільності стандартів та зразків супернатантів при довжині хвилі 450 нанометрів.

Для вірогідної оцінки результатів калібрована стандартна крива при побудові повинна бути лінійною і вказувати на прямо пропорційний характер між рівнем концентрації цитокіну в супернатанті та оптичною щільністю. Дані аналізу проб щодо рівня синтезу цитокінів визначали шляхом їх інтерполяції з отриманою кривою. Математична обробка одержаних результатів проводилася за стандартними методиками варіаційної статистики з урахуванням розбіжностей за t критерієм Ст'юдента, яку оцінювали за допомогою показника довірчої ймовірності (p), меншого за 0,05 (Ласкін Г.Ф., 1980) за допомогою програм Statistica 5,0 for Windows.

Супернатанти, отримані вищевказаною методикою, використовувалися для тестування продукції цитокінів. Під впливом імуномодуляторів групи Ербісолу (Супер Ербісол та Екстра Ербісол) вивчалися слідуєчі ланки імунітету: 1) Моноцитарно-макрофагальна - по продукції ІЛ-1 β , ФНП- α ; 2) Т-хелпери I типу - за спонтанною і стимульованою секрецією ІЛ-2 і γ -ІФ. 3) Т-хелпери II типу - за спонтанною і стимульованою секрецією ІЛ-4 і ІЛ-10.

2.2. Визначення диференційних антигенів Т та В лімфоцитів за допомогою моноклональних антитіл та клітинного цитофлуориметра

Дослідження складу і експресії поверхневого фенотипу імунокомпетентних клітин проводилось в Науковому центрі радіаційної медицини АМН України під керівництвом д.м.н. Базики Д.А. прямим імунофлюоресцентним методом за допомогою панелі моноклональних антитіл (мкАТ), що входять у набір Simultest IMK PLUS (Becton Dickinson, USA) специфічних до поверхневих CD-антигенів лімфоцитів. Аналіз проводили на

проточному цитофлюориметрі FACScan (Becton Dickinson). Набори IMK Plus включали мкАТ для двокольорового аналізу мононуклеарів, помічені флюоресцеїну ізотіоціанатом (FITC) або фікоеритрином (PE), у тому числі контрольні антитіла та мкАТ anti-Leu4-FITC- (CD3) для загальної кількості Т-клітин; anti-Leu4-FITC і anti-HLA-DR-PE для визначення кількості стабільних та активних Т-лімфоцитів; anti-Leu3a-FITC- (CD4) і anti-Leu2-PE (CD8) для оцінки основних регуляторних субпопуляцій; anti-Leu3a-FITC- (CD4) і anti-Leu11-PE (CD16) і anti-Leu19-PE (CD56) для оцінки субпопуляцій цитотоксичних ефекторних лімфоцитів та природних кілерів.

Результати досліджень, їх аналіз та узагальнення.

На початку досліджень була поставлена мета вивчити вплив різних розведень Ербісолу та його похідних на клітини лімфоцитарно-моноцитарного ряду для уявлення про дію цих препаратів на функціональну активність клітин в умовах *in vitro*.

Дослідження впливу різних концентрацій Ербісолу та Супер Ербісолу на активність моноцитарно-макрофагальної системи по продукції інтерлейкіну-1-бета (ІЛ-1 β) та фактору некрозу пухлин-альфа (ФНП- α) у здорових донорів показало, що під дією як Ербісолу, так і Супер Ербісолу продукція ІЛ-1 β змінюється в залежності від їх розведень (за винятком 1:10 000) і є більш ефективною ніж після впливу мітогенів. Препарати в усіх розведеннях вірогідно стимулювали і продукцію ФНП- α (табл.1). Максимальний вплив на продукцію ІЛ-1 β і ФНП- α відбувається за умов дії Ербісолу та Супер Ербісолу в розведенні 1:100, коли продукція цитокіну перевищує спонтанну більш ніж в 4 рази.

Таблиця 1

Показники продукції ІЛ-1 β та ФНП- α (пкг/мл) мононуклеарними клітинами здорових донорів під впливом різних розведень Ербісолу та Супер Ербісолу в умовах *in vitro* (M \pm m)

Показник	1 після дії ФГА 3 розведення	2 Спонт. продукція після дії ЛПС 4			
		а) Е р б і с о л;		в) Супер Ербісол	
		1 : 100 5	1 : 500 6	1 : 1 000 7	1 : 10 000 8
ІЛ-1 β n=15	44,9 \pm 4,08	80,0 \pm 2,6*	101,4 \pm 2,7*	а) 190,6 \pm 12,0*	
	120,0	\pm 8,5*	92,2 \pm 6,7*	49,8 \pm 2,7	
			в) 178,5 \pm 12,5*	116,1 \pm 9,8*	103,2 \pm 4,0*
	52,6 \pm 2,3				
ФНП- α n=15	25,5 \pm 1,7	41,2 \pm 2,9*	79,8 \pm 3,0*	а) 393,1 \pm 11,4*	
	281,4	\pm 11,8*	174,1 \pm 6,8*	94,8 \pm 5,3*	
			в) 358,5		\pm 13,8*

257,5 ±14,9* 177,7 ±5,3* 91,6 ±2,3*
 Примітка: * - різниця достовірна в порівнянні з спонтанною продукцією (p<0,05);

n - кількість обстежених

Продемонстрована нами динаміка впливу на такі важливі ланки імунітету як продукція ІЛ-1β та ФНП-α моноцитарно-макрофагальними клітинами дозволяє вважати Ербісол та його похідний - Супер Ербісол імуностимуляторами, що впливають на активацію неспецифічних факторів захисту організму, чим можна пояснювати їх позитивні клінічні ефекти в багатьох випадках.

Аналіз впливу різних розведень Ербісолу та його похідного - Супер Ербісолу на продукцію цитокінів, що характеризують функціональну активність Т-хелперів І типу, показав вірогідний пропорційний ефект стимуляції в залежності від концентрації, максимальний вплив (підвищення майже в 5 разів продукції γ-ІФ і в 6 - ІЛ-2) відмічено при розведенні Ербісолів 1:100 (табл. 2). Навіть в титрі 1:10000 препарати викликали інтерфероноутворення, яке майже дорівнювало секреції під дією мітогенів та в 2 рази перевищувало спонтанну продукцію γ-ІФ; розведення 1: 10000 не змінювали активність клітин по секреції ІЛ-2.

Таблиця 2

Показники продукції γ-ІФ та ІЛ-2 (пкг/мл) мононуклеарними клітинами здорових донорів під впливом різних розведень Ербісолу та Супер Ербісолу в умовах in vitro (M ± m)

Показник	1		2			
	після дії ФГА 3		після дії ЛПС 4			
	розведення		а) Е р б і с о л; в) Супер Ербісол			
			1 : 100 5	1 : 500 6	1 : 1 000 7	1 : 10 000 8
γ-ІФ n=15	57,5 ±3,5	145,6 ±2,9*	117,4 ±6,5* а)	256,7 ±9,5*		194,3
	±10,1*	126,9	±3,6* 96,0	±2,6*		
			в) 330,2		±11,3*	261,2
	±8,9*	164,7	±5,3* 113,0	±2,8*		
ІЛ-2 n=15	42,6 ±1,8	96,6 ±2,1* 73,1 ±2,4*		а) 242,0 ±10,5*		123,3
	±4,4*	96,3	±3,9* 48,0	±1,9		
			в) 244,2		±6,1*	127,0
	±4,0*	98,4	±3,1* 49,3	±2,3		

Примітка: * - різниця достовірна в порівнянні з спонтанною продукцією (p<0,05);

n - кількість обстежених

Виявлений вплив Ербісолу та його похідних на підвищення продукції таких цитокінів як ІЛ-2 та γ-ІФ має важливе значення для уявлення механізму дії на Т-хелпери І типу.

Цитокіни, що секретують ці лімфоцити, активують макрофаги, натуральні кілери, дозрівання цитотоксичних Т-лімфоцитів-кілерів, забезпечуючи переважний розвиток клітинної імунної відповіді [Калініченко Т.В., Дозморів І.М., 1996; Кашкин К.П., 1999; Сімбірцев А.С., 1998].

Визначення медіаторів, що секретуються переважно Т-хелперами II типу, продемонструвало значний пригнічуючий вплив Ербісолу та його аналогів, при цьому відбувалося підвищення продукції як ІЛ-4, так і ІЛ-10 по мірі зниження концентрації препаратів (табл. 3). Максимальний інгібуючий ефект проявився в розведенні 1:100 - зниження в 4 та 3 рази в порівнянні з спонтанною секрецією відповідно ІЛ-4 і ІЛ-10.

Таблиця 3

Показники продукції ІЛ-4 та ІЛ-10 (пкг/мл) мононуклеарними клітинами здорових донорів під впливом різних розведень Ербісолу та Супер Ербісолу в умовах *in vitro* ($M \pm m$)

Показник	1		2			
	після дії ФГА 3		після дії ЛПС 4			
	розведення		а) Е р б і с о л; в) Супер Ербісол			
			1 : 100 5	1 : 500 6	1 : 1 000 7	1 : 10 000 8
ІЛ-4 n=15	12,5 ±0,4	13,6 ±0,6	17,1 ±0,9*	а) 3,0 ±0,5*		4,2
±0,4*	5,1	±0,5*	7,5	±0,7*		
				в) 3,3	±0,5*	4,5
±0,5*	5,4	±0,5*	8,0	±0,5*		
ІЛ-10 n=15		84,9 ±3,2	110,4 ±3,9*	139,3 ±7,1*а)	30,4 ±4,3*	45,3
±3,6*	55,8	±3,2*	70,9	±3,1*		
				в) 29,2 ±1,8*	47,0 ±2,8*	59,6 ±3,4*
						72,4 ±2,9*

Примітка: * - різниця достовірна в порівнянні з спонтанною продукцією ($p < 0,05$);

Метою наступних досліджень було провести порівняльний аналіз препаратів Ербісолу - Ербісол, Супер Ербісол та Екстра Ербісол за їх впливом на продукцію медіаторів імунітету. Вищеописані експерименти виявили максимальний вплив на імунокомпетентні клітини при розведенні препаратів 1:100, тому в подальших дослідженнях використовували саме цю дозу.

Ми вважали за необхідне, визначаючи функціональні параметри клітин, спочатку виявити, чи впливають ці препарати на мембрани імунокомпетентних клітин, і провести експериментальні дослідження експресії диференційованих антигенів за допомогою імунофлуоресцентного методу.

Дослідження експресії диференційних поверхневих антигенів лімфоцитів крові 15 здорових донорів показали, що всі похідні Ербісолу вірогідно змінювали в порівнянні з рівнем до інкубації: число не-Т клітин-хелперів, що несуть рецептор до ІЛ-2 (CD25+) від

0,44±0,03 до 2,02±0,08 та 2,7±0,06% (p<0,05); Супер Ербісол підвищував рівень Т-кілерів (CD3+16+56+) від 3,69±0,6 до 7,67±0,5% (p<0,05). Інших вірогідних змін не виявлено. Але при порівнянні з лімфоцитами, інкубованими в культуральному середовищі, продемонстровано: якщо знаходження клітин в культуральному середовищі на протязі 24 годин вірогідно знижувало експресію поверхневих антигенів, що визначають фенотип Т-лімфоцитів (CD3+22-), Т-хелперів/індукторів (CD4+8-), Т-активних (CD3+DR+) та Т-хелперів з рецепторами до ІЛ-2 (CD25+), то присутність препаратів Ербісолу дозволила зберігатись показникам на рівні як і до інкубації. В той же час препарати практично не змінювали знижений внаслідок інкубації рівень В-лімфоцитів (CD3-19+) та вірогідно знижували рівень CD3-DR+ активних В-лімфоцитів.

Таблиця 4

Фенотипічна характеристика імунокомпетентних клітин у здорових донорів до та після впливу Ербісолу та його похідних в умовах *in vitro* (M ± m)

Клітини (фенотип) n - 15	Норма (%)	До інкубації			Після
		Культур. середовище	Ербісол	Супер	
Ербісол	Екстра Ербісол	1	2	3	4
Т-лімфоцити (CD3+22-)	60±8,1%	69,4±3,0	60,15±2,2	62,96±2,5	72,65±3,6
Т-хелп/інд. (CD4+8-)	39±5,5%	44,6±2,3	39,4±2,3 p ₃₋₄ <0,05	27,7±1,9 p _{4-5,6,7} <0,05	36,5±2,3
Т-супр./цит. (CD4-8+)	27,1±3,3%	28,3±2,0	21,22±3,6	24,72±1,8	25,2±1,8
Т-кілери (CD3+16+56+)	5,2±1,8%	3,69±0,6	3,1±0,3	4,58±0,8	7,67±0,5
п ₃₋₆ <0,05	3,91±0,3				
N-кілери (CD3-16+56+)	8,5±2,3%	9,02±0,8	2,11±0,09	3,41±0,02	1,96±0,1
Т-активні (CD3+DR+)	6,4±0,8%	8,84±0,5	3,79±0,07	5,3±0,02	2,85±0,04
В-лімфоцити (CD3-19+)	7,3±1,5%	10,51±0,8	3,37±0,09	2,13±0,02	2,81±0,02
В-л-активні (CD3-DR+)	6,1±2,4%	9,92±0,2	7,56±0,09	5,55±0,03	5,19±0,05
CD4+25-	32±3,1%	41,35±4,0	29,49±3,2	41,55±2,6	41,23±2,9
CD4+25+	4,4±0,3%	3,8±0,3	1,34±0,09	3,76±0,1	2,42±0,2
CD4-25+	1,0±0,08%	0,74±0,09	1,17±0,1	2,02±0,08	2,7±0,06
п ₃₋₆ <0,05	1,64±0,09	п ₃₋₇ <0,05		п ₃₋₅ <0,05	

Примітка: n - кількість обстежених

Порівняльний аналіз Ербісолу та його похідних (Ербісол, Супер Ербісол та Екстра Ербісол) показав, що всі вони підвищують функціональну активність моноцитів/макрофагів за продукцією ІЛ-1 (в 3 рази) та ФНП-α (в 15 разів, максимальний ефект був у Ербісолу).

Таблиця 5

Показники продукції ІЛ-1β та ФНП-α (пкг/мл) мононуклеарними клітинами здорових

ІЛ-10 n=10 86,0 ±2,0 112,7 ±2,4* 148,7 ±4,9* 27,6 ±2,6* 27,8 ±3,5
38,4 ±3,8*

Примітка: * - різниця достовірна в порівнянні з спонтанною продукцією (p<0,05);

n - кількість обстежених

Таким чином, встановлено, що всі похідні Ербісолу демонструють виражений стимулюючий ефект на моноцитарно-макрофагальну ланку імунітету та Т-хелпери І типу. Супер Ербісол є найбільш ефективним стимулятором функціональної активності Т-хелперів І; він же, так само як і Ербісол, ефективно знижує цитокінпродукуючу здатність Т-хелперів ІІ.

Виявлені ефекти Ербісолу та його похідних спонукали до наступного етапу досліджень, що були спрямовані на визначення можливості використання препаратів у пацієнтів з таким складним в медико-соціальному відношенні захворюванням як хронічний сечостатевої хламідіоз. Хронічна хламідійна інфекція наносить суспільству демографічний та економічний збиток, який оцінюється астрономічними сумами. Сечостатева інфекція є в значному числі випадків причиною безпліддя та пусковим механізмом при реактивних артритях у чоловіків, а також фактором ризику раку шийки матки та простати [Битти В.Л. и соавт., 1995; Бобков Ю.А. и соавт., 1999; Башмакова М.А. и соавт., 2000]. В зв'язку з цим зрозумілий інтерес науковців до розробки нових ефективних методів терапії даної патології.

Дослідження, проведені в лабораторії імунології Інституту урології та нефрології АМН України, дозволили продемонструвати особливості деяких факторів, що характеризують функціональну активність імунокомпетентних клітин, та показати, що зниження функціональної активності Т-хелперів І типу на фоні високої - Т-хелперів ІІ, можуть бути важливими ланками імунопатогенезу хронічного хламідіозу.

Дослідження показали, що середній показник спонтанної продукції ІЛ-1 у хворих на ХССХ вірогідно вище, ніж у здорових - 156,5±6,2 в порівнянні з 44,9±1,29 пкг/мл (p<0,01). Активація імунокомпетентних клітин хворих мітогенами призводила до вірогідного зменшення продукції монокіну і становила в середньому 119,0±5,0 пкг/мл (p<0,05). Додавання ж до імунокомпетентних клітин хворих Ербісолу сприяло підвищенню продукції ІЛ-1 майже в 1,5 рази, що становило в середньому 211,7±7,2 пкг/мл (p>0,05).

Приймаючи до уваги важливу роль оксиду азоту в патогенезі хламідійної інфекції [Igietseme G.U. et all., 1997; Scott P., Kaufmann Sh.E., 1991; Малишев І.Ю., 1997], однією з задач було дослідження цього фактору кисневонезалежного механізму резистентності клітин до інфекції. Вивчалась продукція оксиду азоту у 42 хворих з ХССХ та 15 здорових донорів з використанням методу [Houli Joang, Balazy Michael, 1998], який базується на здатності

поліморфноядерних лейкоцитів синтезувати NO з амінокислоти L-аргініну за допомогою ферменту NO-синтази, яка продукується макрофагами в відповідь на бактеріальні ендотоксини або прозапальні цитокіни. Отримані дані свідчать, що спонтанна та стимульована продукція оксиду азоту у хворих з ХССХ перевищувала показники у здорових відповідно в 2,5 та 3 рази. Індукція за допомогою Ербісолу призводила до ще більшого підвищення рівня оксиду азоту у хворих: майже в 3 рази в порівнянні з спонтанною, та в 2 рази - з індукованою мітогеном продукцією NO.

Дослідження функціональної активності Т-хелперів I показали, що у хворих з сечостатевим хламідіозом спонтанна продукція γ -ІФ в середньому складає $17,0 \pm 0,4$ пкг/мл, що в 3 рази нижче рівня γ -ІФ у здорових донорів. Активація клітин мітогеном ФГА призводить до підвищення продукції γ -ІФ, і складає $46,7 \pm 1,5$ пкг/мл, що в 3 рази нижче ніж у здорових донорів. Вважаємо таку низьку стимульовану продукцію медіатору у пацієнтів прогнозонегативною ознакою для боротьби з хламідіями. Але резерв продукції такий, як у здорових, тобто стимуляція мітогеном в обох випадках призводить до 3-х кратного підвищення, що дозволяє вважати доцільним пошуки додаткових індукторів продукції інтерферонів у хворих. Саме тому вважали доцільним визначити можливості впливу на клітини пацієнтів з ХССХ препарату Ербісолу, використовуючи Супер Ербісол як найбільш ефективний для стимуляції активності Т-хелперів. Додавання Супер Ербісолу до клітин хворих на ХССХ призводило до підвищення секреції γ -ІФ від спонтанної в 5 разів та в 1,8 рази в порівнянні з стимулюванням клітин мітогеном ФГА - відповідно $84,5 \pm 3,6$ та $46,7 \pm 1,5$ пкг/мл ($p < 0,001$). Хоча, що індукована препаратом Супер Ербісол секреція лімфокіну не досягала рівню мітогеніндукованої у здорових, але вона вірогідно перевищувала спонтанні показники у донорів.

Відомо, що високі дози γ -ІФ повністю інгібують ріст хламідій, низькі ж - навпаки, індукують розвиток морфологічно аберантних форм включень [Scott P., Kaufmann Sh.E., 1991]. Тому виявлені нами можливості підвищення рівню медіатору дуже важливі для запобігання формуванню патологічних морфологічних форм Ch. Trachomatis.

Вивчення функціональної активності Т-хелперів II показало, що рівень спонтанної продукції ІЛ-10 у хворих з хламідіозом в середньому склав $368,3 \pm 11,5$ пкг/мл, що в 2,6 рази перевищує цей показник у здорових донорів. При стимулюванні клітин хворих з ХССХ мітогеном не відбувалося вірогідних змін продукції, що становила $384,0 \pm 10,2$ пкг/мл ($p > 0,05$). При додаванні Супер Ербісолу в культуру клітин хворих на ХССХ спостерігали зниження продукції ІЛ-10, що становило в середньому $240,3 \pm 9,3$ пкг/мл ($p < 0,05$), це в 1,5 рази менше,

ніж спонтанна секреція ІЛ-10 у хворих ХССХ *in vitro*.

Представлені дані продемонстрували, що препарат Супер Ербісол проявляє імуносупресуючу дію на продукцію ІЛ-10, рівень якої на фоні високої активації Т-хелперів II типу у пацієнтів з ХССХ підвищений. Це може мати значення для успішної боротьби з хронічною хламідійною інфекцією, тому що висока продукція ІЛ-10 відіграє важливу роль в патогенезі ХССХ. Відомо, що ІЛ-10 інгібує продукцію активованими моноцитами ІЛ-1, -6, -8, -12, α -ІФ, α -ФНП, супероксидних та нітроксидних радикалів, антигенпрезентуючу функцію макрофагів за рахунок зниження експресії НLA-антигенів II класу на їх мембрані, продукцію Т-хелперами I типу γ -ІФ [Витковский Ю.А. и соавт., 2001; Рубцова И.Е. и соавт., 2002].

Таким чином, завдяки проведеним дослідженням стало можливим сформулювати основні напрямки дії нового вітчизняного препарату Ербісолу та його похідних (Супер Ербісолу та Екстра Ербісолу) на функціональну активність імунокомпетентних клітин. Виявлено, що ці препарати підвищують активність моноцитарно-макрофагальної ланки завдяки вірогідним змінам продукції клітинами ІЛ-1 β і ФНП- α . Важливим науково-обґрунтованим фактом можна вважати стимулюючий вплив на функціональну активність Т-хелперів I типу за продукцією ними ІЛ-2 та γ -ІФ та інгібуючий - на Т-хелпери II за продукцією ними таких протизапальних цитокінів як ІЛ-4 та ІЛ-10.

Результати проведеної роботи дозволяють вважати препарати індукторами ключових медіаторів імунної системи - прозапальних цитокінів. Отримані інтерферон-стимулюючі ефекти досліджених препаратів (найбільш виражені у Супер Ербісолу) представляють великий інтерес завдяки доцільності застосування як препаратів інтерферону, так і його стимуляторів при різних захворюваннях.

Виявлені в результаті роботи можливості впливу на ліквідування дисбалансу активності Т-хелперів та корекцію продукції цитокінів у пацієнтів з ХССХ за допомогою Ербісолу та його похідних дозволять використовувати препарати як для комплексної терапії у випадках сечостатевого хламідіозу, так і для розробки перспективних напрямків імунотерапії при інших патологіях.

Висновки

У дисертації наведено теоретичне узагальнення та нове вирішення актуальної медико-біологічної проблеми по встановленню впливу препарату Ербісол та його похідних (Супер Ербісолу та Екстра Ербісолу) на функціональну активність імунокомпетентних клітин Т-хелперів I та II типів за продукцією ними медіаторів імунної відповіді.

1. В умовах *in vitro* Ербісол та його похідні (Супер Ербісол та Екстра Ербісол)

справляють імуностимулюючий вплив на функціональну активність клітин моноцитарно-макрофагального ряду через продукцію ІЛ-1 β та ФНО- α , що свідчить про активацію цими препаратами неспецифічних факторів захисту організму.

2. Ербісол та його похідні підвищують функціональну активність Т-хелперів 1 типу за продукцією ІЛ-2 та γ -ІФ при визначених розведеннях (1:100, 1:500, 1:1000), перевищуючи спонтанну секрецію медіаторів в 5 разів, а можливості мітогенів - майже в 2 рази за умов використання концентрації 1:100. Інтерферон-індукуючу активність демонструють також розведення препаратів 1:10 000, що свідчить про значний вплив препаратів на цю ланку імунітету.
3. Ербісол та його аналоги вірогідно пригнічують функціональну активність імунокомпетентних клітин здорових донорів по продукції ІЛ-4 та ІЛ-10, що свідчить про їх інгібуючий вплив на Т-хелпери II типу.
4. При порівняльному аналізі ефектів Ербісолу та його похідних (Супер Ербісолу та Екстра Ербісолу) за їх впливом на цитокін-продукуючу здатність імунокомпетентних клітин здорових донорів, звертає увагу найбільш виражений вплив Супер Ербісолу на функціональну активність Т-хелперів I типу.
5. В умовах *in vitro* Ербісол та його похідні стимулюють експресію рецепторів до ІЛ-2 (CD25+) та антигенів, що визначають фенотип Т-кілерів (CD3+16+56+); виявляють протекторну дію по відношенню до клітин Т-ланки імунітету, не відновлюючи при цьому знижені після 24-годинної інкубації в фізіологічному розчині параметри експресії антигенів В-клітин.
6. Ербісол та його похідні посилюють продукцію ІЛ-1 β та NO клітинами хворих з ХССХ, що свідчить про підвищення ними факторів неспецифічного імунітету і кисневонезалежних механізмів кілінгу патогенів та демонструє задовільні компенсаторні резерви імунокомпетентних клітин пацієнтів.
7. Застосування Ербісолу та його похідних *in vitro* призводить до підвищення продукції γ -ІФ лімфоцитами хворих на ХССХ за рахунок посилення активації Т-хелперів 1 типу та пригнічення секреції ІЛ-10 Т-хелперами 2 типу.
8. Використання Ербісолу та його похідних *in vivo* дозволить зменшити інгібуючу дію на Т-хелпери I типу з боку Т-хелперів II за рахунок зниження високої продукції протизапального цитокіну ІЛ-10 та посилити функціональну активність перших, чим сприяти посиленню клітинного імунітету як важливого фактору протихламідійного захисту.

СПИСОК ОСНОВНИХ ПУБЛІКАЦІЙ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

1. Дріянська В.Є., Ващенко В.В., Кушко Л.Я., Григоренко І.П., Сухін Р.Є., Федорук Г.В., Фесенкова В.І., Драннік Г.М. Стан імунітету та продукція інтерлейкіну-10 у хворих на урогенітальний хламідіоз // Галицький лікарський вісник. - 2000. - №3. - С. 40-43.
2. Дранник Г.Н., Дрянская В.Е., Ващенко В.В., Фесенкова В.И., Савченко В.С., Дрянская В.В. Состояние иммунитета у больных с хроническим мочеполовым хламидиозом // Український журнал гематології та трансфузіології. - 2002. - №5. - С.23-24.
3. Драннік Г.М., Дріянська В.Є., Фесенкова В.Й., Бойко М.І. Експериментальні дослідження впливу Супер ербісолу на продукцію гама-інтерферону та інтерлейкіну-10 лімфоцитами хворих на хронічний сечостатевий хламідіоз // Імунологія та алергологія. - 2003. - №2. - С. 48-52.
4. Дріянська В.Є., Драннік Г.М., Горпінченко І.І., Фесенкова В.Й., Ващенко С.М. Продукція інтерлейкіну-1 і оксиду азоту у хворих на хронічний сечостатевий хламідіоз та вплив Ербісолу на ці показники в умовах *in vitro* // Імунологія та алергологія. - 2003. - №1. - С. 5-7.
5. Дранник Г.Н., Дрянская В.Е., Ващенко В.В., Фесенкова В.И., Папакина В.С., Дрянская В.В. Продукция цитокинов у больных хроническим урогенитальным хламидиозом в динамике лечения с использованием иммуотропной терапии // Цитокины и воспаление (Cytokines & Inflammation). - 2002. - Том 1, №2. - С. 112.
6. Фесенкова В.Й., Папакіна В.С., Дрянская В.Е. Вплив Ербісолу на продукцію цитокінів імунокомпетентними клітинами здорових донорів в умовах *in vitro* // Імунологія та алергологія. - 2002. - №2. - С. 59.
7. Фесенкова В.Й., Драннік Г.М., Дріянська В.Є., Папакіна В.С., Ващенко С.М. Дослідження *in vitro* впливу препаратів Ербісол на продукцію інтерлейкіну-2 та γ -інтерферону Т-хелперами I типу здорових донорів // Лабораторна діагностика. - 2003. - №2. - С.37-40.
8. Драннік Г.М., Фесенкова В.Й., Дріянська В.Є., Папакіна В.С., Ніколаєнко О.М., Назар О.В. Дослідження впливу препаратів “Ербісолу” на функціональну активність Т-хелперів II типу за продукцією ІЛ-4 та ІЛ-10 *in vitro* // Лікарська справа. - 2003. - №3. - С.113-117.

АНОТАЦІЯ

Фесенкова В.Й. Вплив препарату Ербісол на функціональну активність імунокомпетентних клітин. - Рукопис.

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.09 - імунологія (біологічні науки). Національний медичний університет ім.О.О.Богомольця МОЗ України, Київ, 2003.

Роботу присвячено вивченню впливу препарату "Ербісол" та його похідних на функціональну активність імунокомпетентних клітин.

Визначений вплив різних доз Ербісолу на функціональну активність макрофагально-фагоцитарної ланки за секрецією ІЛ-1 β та ФНП- α , Т-хелперів I типу (Т-х I) за продукцією ними ІЛ-2 та γ -ІФ, Т-хелперів II типу (Т-х II) за секрецією ними ІЛ-4 та ІЛ-10. Показано, що препарат майже в усіх використаних концентраціях (при максимальній дії розведення 1:100) підвищує продукцію ІЛ-1 β і ФНП- α клітинами моноцитарно-макрофагальної ланки та ІЛ-2 і γ -ІФ Т-хелперами I типу. Вперше продемонстровано, що Ербісол та його похідні (Супер Ербісол та Екстра Ербісол) сприяють зниженню функціональної активності Т-хелперів II типу за продукцією таких протизапальних цитокінів як ІЛ-4 та ІЛ-10. При порівняльному аналізі ефектів Ербісолу, Супер Ербісолу та Екстра Ербісол не виявлено суттєвої різниці за їх впливом на цитокінпродукуючу здатність імунокомпетентних клітин здорових донорів, за винятком найбільш вираженого впливу Супер Ербісолу на функціональну активність Т-хелперів I типу за продукцією ІЛ-2 та γ -ІФ. Проведені дослідження дозволяють визначити механізми дії нового вітчизняного препарату Ербісолу, головними напрямками якої є стимуляція імунної системи за рахунок підвищення цитокін-продукуючої здатності моноцитів/макрофагів та Т-лімфоцитів хелперів I; зниження секреторної активності Т-лімфоцитів хелперів II може бути наслідком зростання активності Т-х I.

Визначені ефекти препарату та його похідних зберігались *in vitro* при дослідженні імунокомпетентних клітин хворих на хронічний сечостатевиий хламідіоз. Продемонстровано вірогідне підвищення під впливом Ербісолу продукції ІЛ-1 β та NO як факторів неспецифічного імунітету та киснево незалежних механізмів клінінгу, такого важливого фактору протихламідійного імунітету як γ -ІФ разом з пригніченням протизапального цитокіну ІЛ-10.

Якщо після інкубації клітин *in vitro* відбувається пригнічення експресії поверхневих

антигенів лімфоцитів (CD3+, CD4+, CD3+16+56+, CD3+DR+, CD25+), то Ербісол та його похідні демонструють протекторну дію по відношенню до клітин Т-ланки імунітету (відповідно Т-лімфоцитів, Т-хелперів, Т-кілерів, Т-активних та Т-хелперів рецепторами до ІЛ-2 (CD25+) і не відновлюють знижені після інкубації *in vitro* параметри експресії антигенів В-клітин (CD3-19+, CD3-DR+).

Таким чином, вперше показані імуностимулюючі та протекторні ефекти препарату Ербісол та його похідних (Супер Ербісолу та Екстра Ербісолу) на основі дослідження факторів міжклітинної кооперації (продукції медіаторів та експресії рецепторів і антигенів, що визначають фенотипічні особливості); визначені особливості порушень імунітету, які свідчать про можливість застосування цих препаратів, як це продемонстровано на прикладі такої патології як хронічний сечостатевої хламідіоз.

Ключові слова: цитокіни, Т-хелпери I та II типів, Ербісол.

АННОТАЦИЯ

Фесенкова В.И. Влияние препарата Эрбисол на функциональную активность иммунокомпетентных клеток. - Рукопись.

Диссертация на соискание научной степени кандидата биологических наук по специальности 03.00.09 - иммунология (биологические науки). Национальный медицинский университет им.О.О.Богомольца МОЗ Украины, Киев, 2003.

В диссертации представлены результаты изучения функциональной активности иммунокомпетентных клеток здоровых и больных хроническим мочеполовым хламидиозом по продукции цитокинов под влиянием препарата Эрбисол и его производных, проведение сравнительного анализа влияния Эрбисола, Супер Эрбисола и Экстра Эрбисола на иммунокомпетентные клетки по продукции ими ряда лимфо- и монокинов. Результаты исследования позволили сделать вывод, что Эрбисол и Супер Эрбисол являются иммуностимуляторами, которые влияют на активацию неспецифических факторов защиты организма.

В результате исследований определено влияние различных доз Эрбисола (разведения 1:100, 1:500, 1:1000 и 1:10000) на функциональную активность макрофагально-фагоцитарного звена по секреции ИЛ-1 β и ФНО- α , Т-хелперов I типа (Т-х I) по продукции ими ИЛ-2 и γ -ИФ, Т-хелперов II типа (Т-х II) по секреции ими ИЛ-4 и ИЛ-10. Показано, что препарат почти во всех использованных концентрациях (максимальный эффект - при разведении 1:100) повышает продукцию ИЛ-1 β и ФНО- α

клетками моноцитарно-макрофагального звена и ИЛ-2 и γ -ИФ Т-хелперами 1 типа. Впервые продемонстрировано, что препарат Эрбисол и его производные способствуют снижению функциональной активности Т-хелперов II типа по продукции таких противовоспалительных цитокинов как ИЛ-4 и ИЛ-10.

При сравнительном анализе эффектов Эрбисола, Супер Эрбисола и Экстра Эрбисола не определено существенной разницы по влиянию на цитокинпродуцирующую способность иммунокомпетентных клеток здоровых доноров. Исследования *in vitro* показали, что все производные Эрбисола повышают функциональную активность моноцитов/макрофагов по продукции ИЛ-1 β (в 3 раза) и ФНО- α (в 15 раз, максимальный эффект продемонстрировал препарат “Эрбисол”); происходит увеличение продукции ИЛ-2 и интерферонов (α , β , γ) в 3-4 раза, при этом самый сильный эффект - стимуляцию в 6 раз как ИЛ-2 так и γ -ИФ - продемонстрировал Супер Эрбисол.

Проведенные исследования позволяют определить механизмы действия нового отечественного препарата Эрбисола, главным направлением которого является стимуляция иммунной системы за счет повышения цитокинпродуцирующей способности моноцитов/макрофагов и Т-лимфоцитов хелперов 1; снижение секреторной активности Т-лимфоцитов хелперов II может быть следствием увеличения активности Т-х 1.

Те эффекты Эрбисола, которые были определены у здоровых доноров, сохранялись *in vitro* при исследовании иммунокомпетентных клеток больных с хроническим мочеполовым хламидиозом. Продемонстрировано достоверное повышение под влиянием Эрбисола и его аналогов продукции ИЛ-1 β и NO как факторов неспецифического иммунитета и кислороднезависимых механизмов киллинга, такого важного фактора противохламидийного иммунитета как γ -ИФ одновременно с угнетением противовоспалительного цитокина ИЛ-10.

Исследование экспрессии дифференцировочных поверхностных антигенов лимфоцитов крови 15 здоровых доноров показало, что все производные Эрбисола достоверно изменяли в сравнении с уровнем до инкубации: число не-Т-хелперов, которые несут рецептор к ИЛ-2 (CD25+) от $0,44 \pm 0,03$ до $2,7 \pm 0,06\%$ ($p < 0,05$); Супер Эрбисол повышал уровень Т-киллеров (CD3+16+56+) от $3,69 \pm 0,6$ до $7,67 \pm 0,5\%$ ($p < 0,05$). Показано, что если после инкубации клеток *in vitro* происходит угнетение экспрессии поверхностных антигенов лимфоцитов (CD3+, CD4+, CD3+16+56+, CD3+DR+, CD4+25+), то Эрбисол демонстрирует протекторное действие по отношению к клеткам Т-звена иммунитета (соответственно Т-лимфоцитов, Т-хелперов, Т-киллеров, Т-активных и Т-хелперов с рецепторами к ИЛ-2 и не восстанавливает сниженные после инкубации *in vitro* параметры экспрессии антигенов

В-клеток (CD3-19+, CD3-DR+).

Таким образом, впервые показаны иммуностимулирующие и протекторные эффекты Эрбисола на основании исследования факторов межклеточной кооперации (продукции медиаторов и экспрессии рецепторов и антигенов, которые определяют фенотипические особенности клеток); определены особенности нарушения иммунитета, которые свидетельствуют о возможности применения этих препаратов, как это продемонстрировано на примере такой патологии как хронический мочеполовой хламидиоз.

Ключевые слова: цитокины, Т-хелперы I и II типов, Эрбисол.

SUMMARY

Fesenkova V.I. The influence of the Erbisol on functional activity of immunocompetent cells.
- Manuscript.

The dissertation has been submitted for winning the scientific degree Candidate of Biological Sciences on speciality 03.00.09 - Immunology (biological sciences), National Medical University named by Bogomolets, Kyiv, 2003.

The work is designed to study the influence of the Erbisol class preparations on functional activity of immunocompetent cells.

There was determined the action of various Erbisol doses on functional activity of macrophage phagocytic linkage by secretion of IL-1 β and TNF- α , of T-helpers type I (ThI) by their production of IL-2 and γ -IF, of T-helpers type II (ThII) by their secretion of IL-4 and IL-10. The preparations used in different concentrations (with maximum dilution 1:100) showed the increase in production of IL-1 β and TNF- α by cells of macrophage monocytic linkage and IL-2 and γ -IF by T-helpers type I. It was demonstrated first time that Erbisols foster the decrease in functional activity of T-helpers type II with production of such anti-inflammatory cytokines as IL-4 and IL-10.

The determined effects of preparations were retained in vitro in the study of the immunocompetent cells of patients with chronic urogenital chlamydiosis. There was demonstrated the statistical increase of immune cells, under the action of Erbisol preparations, in production of IL-1 β and NO as factors of unspecific immunity and oxygen-independent mechanisms of killing, such an important factor of antichlamydial immunity as γ -IF along with inhibition of anti-inflammatory cytokine IL-10.

If after incubation of cells in vitro the expression of membrane antigens of lymphocytes (CD3+, CD4+, CD3+16+56+, CD3+DR+, CD4+25+) is inhibited then the Erbisol preparations demonstrate the protective action in relation to the immune T-line cells (T-lymphocytes, T-helpers,

T-killers, T-active and T-helpers by receptors to IL-2 (CD25+), respectively) and do not restore of expression of antigens to B-cells (CD3-19, CD-DR+) after incubation and decreased parameters this expression.

Thus, the immunostimulating and protective effects of the Erbisol preparations were demonstrated first time on the basis of investigating the factors of intercellular cooperation (production of mediators and expression of receptors and antigens which define phenotypical specificities); there were elucidated the peculiar disturbances of immunity which suggest the possibility to use these preparations, as it was demonstrated in cases of such a pathology like chronic urogenital chlamydiosis.

Key words: cytokines, T-helpers type I and II, membrane antigens, class Erbisol preparations.