

# ДОСЛІДЖЕННЯ ІМУНОТРОПНОЇ АКТИВНОСТІ ПРЕПАРАТІВ УКРАЇН В ЕКСПЕРИМЕНТІ

Ю. Я. Гріневич, Г. Д. Бендюг, Н. М. Храновська, С. В. Мартиненко,  
Г. Г. Кадькаленко

Інститут онкології АМН України, м. Київ

## ВСТУП

Основна функція імунної системи – контроль за постійністю генетично продетермінованого антигенного складу тканин організму. В імунній системі виділяють центральні (тимус, кістковий мозок), в яких здійснюється диференціювання лімфоцитів в зрілі форми, та периферійні (селезінка, лімфатичні вузли), де відбувається формування імунної відповіді, ограні. Відомо, що тимус продукує цілий ряд гормонів, одним із них є тимусний сироватковий фактор – ТСФ, який Bach J.F., Dardenne M. (1973) [1] виявили по здатності відновлювати чутливість спленоцитів тимектомованих мишей до антитимоцитарної сироватки чи азатиоприну. Цей гормон набуває свою активність в присутні  $Zn^{++}$ , і має назву тимулін. Він регулює дозрівання та диференціювання Т-лімфоцитів в самому тимусі та на периферії [2]. Раніше в науково-дослідній лабораторії клінічної імунології Інституту онкології АМН України було показано, що при введенні деяких імунотропних препаратів тимектомованим мишам в сироватці крові з'являються речовини з тимозиноподібною активністю (РТПА) [3]. Тривалість індукції синтезу РТПА різна і залежить від біологічних властивостей препарату.

В теперішній час існує багато імуномодуючих засобів, до яких відносять і україн – препарат, до складу якого входять алкалоїди чистотілу великого та тіофосфорна кислота. Однак їх імунобіологічні механізми дії на імунну систему вивчено недостатньо.

В зв'язку з цим, метою даного дослідження є вивчити вплив препарату україн на ендокринну функцію тимусу, синтез РТПА *in vivo* і *in vitro* та деякі показники, що характеризують стан периферійної ланки імунної системи організму в експерименті.

## ОБ'ЄКТ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

Експерименти проведені на 138 білих мишах, самках, 2-х місячного віку, масою 18–22 г розведення Інституту онкології АМН України. Тимектомію проводили під гексеналовим наркозом. Мишей брали в дослід через 10–14 днів після операції. Препарат україн (серія 890309) вводили внутрішньом'язово в об'ємі 0,2 мл. В експериментах використовували цільний препа-

рат та розведений дистильованою водою в 10, 100 та 1000 разів.

Титр ТСФ та РТПА визначали в пуваток від 5–6 тварин за методом Bach та [1] через 4, 24, 48, 72, 96, 120 та 144 годин'екції. Для контролю індукції синтезу використовували спленін (0,2 мл в рідині 1:200). З метою вивчення здатності уклітин індукції синтезу РТПА *in vitro* лімфоцити епітеліальні клітини тимуса інкубували в присутності препарату україн, розведеним серед 199 в 10, 100 та 1000 разів (кінцева концентрація клітин –  $1 \times 10^6$ /мл) впродовж 2-х год при 1000 об./хв. Клітини осаджували центрифугуванням при 5 хв при 1000 об./хв. Надсад пропускали через фільтр "Amicon" (50 Б) для очищення від молекулярних інгібіторів ТСФ.

Для вивчення впливу україн на стан органів імунної системи у тварин використовували препарат в дозі 0,1 мг/кг, котрий вводили в об'ємі 0,2 мл внутрішньом'язово, через інтервали в 10 днів, всього 5 ін'екцій. Групи тварин одержувала по 0,2 мл дистильованої води. Дослідження проводили через 7 днів після останньої ін'екції.

У відповідний час тварин зважували, виважували під ефірним наркозом, проводили розтин крові та органів для досліджень. Визначали абсолютну та відносну масу тимусу, селезінки, кількість в них лімфоїдних клітин (Лф-клітин), кількість лейкоцитів в периферійній крові. В периферійній крові пофарбованих за Романовським, підраховували лейкограму та кількість великих гранулоцитів – ВГЛ [4]. Рівень НК-активності визначали за допомогою нерадіометричного методу, де за клітини-мішені використовували еритроцити курей [5]. Здатність спленоцитів до вироблення інтерферонів визначали за допомогою біологічного методу [6] додаючи до  $10^6$  спленоцитів 0,1 мл сироватки Ньюкасла (ВХН) з інфекційним вірусом  $10^8$ – $10^9$  ТЦД 50 мл ( $\gamma$ -інтерферон), ФГА ( $\gamma$ -інтерферон) чи 0,1 мл середовища (спонтанний інтерферон). Активність інтерферону визначали по його здатності пригнічувати токсичну дію ВХН по відношенню до нослоїної культури клітин – L 929.

Мишей імунізували тимусозалежним антигеном – еритроцитами барана, який вводили

рішньочередно в дозі  $1 \times 10^8$  в 0,5 мл фізіологічного розчину. Гуморальну імунну відповідь оцінювали по кількості АУК в селезінці тварин, яку визначали на 5-ту добу після імунізації за допомогою методу локального гемолізу в гелі [7]. Кількість Т-лімфоцитів в периферійній крові тварин досліджували методом спонтанного розеткоутворення (Е-РУК), який заснований на виявленні рецепторів на поверхні Т-клітин мишей до еритроцитів кроля. Макрофаги перитонеального ексудату у тварин отримували згідно описаного методу [8] та вивчали адгезивні властивості цих клітин [9].

Одержані результати оброблені статистично із застосуванням "t" критерію Стьюдента.

**РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ**

Дія біологічно активних речовин на імунологічні показники в значній мірі визначається введеною дозою препарату. Виходячи з цього, україн вводили мишам в дозі від 0,01 мг/кг до 10 мг/кг. Дані впливу різних доз препарату україн на ендокринну функцію тимуса, яку оцінювали по рівню ТСФ ( $\log_2$  титра), представлені в табл. 1. Як свідчать отримані результати, введення препарату в дозах 10 мг/кг та 1,0 мг/кг супроводжується збільшенням  $\log_2$  титра ТСФ відповідно у тварин до 5,5 та 7,0 проти 4,0 в контрольній групі. Одноразове введення 0,1 мг/кг або 0,01 мг/кг препарату практично не впливає на ендокринну функцію тимуса тварин.

Таблиця 1

**$\log_2$  титра\* ТСФ та РТПА у сироватці крові мишей різних груп**

№ пп	Група	Нормальні миші	Тимектомовані миші
1.	Контроль	4,0	1,0
2.	+ україн в дозі:		
3.	10мг\кг	5,5	4,0
4.	1 мг\кг	7,0	4,0
5.	0,1 мг\кг	2,5	5,0
6.	0,01 мг\кг	3,0	5,0

\* - титр ТСФ та РТПА визначали через 24 год після введення препаратів в пулі сироваток від 5-6 мишей.

Як встановлено нами раніше, ін'єкції деяких імуномодуляторів тимектомованим мишам супроводжуються підвищенням титра РТПА [3]. Ми досліджували вплив різних доз препарату україн на цей показник. Дані цієї ж таблиці показують, що внутрішньом'язове введення україн тимектомованим мишам визиває збільшення концентрації РТПА в 4-5 разів, тобто до такого рівня, як у нормальних мишей.

Таким чином, найбільш вираженою здатністю впливати на ендокринну функцію тимуса у нормальних тварин володіє препарат україн в дозі 1,0 мг/кг та 10,0 мг/кг маси тіла тварин, а на індукцію синтезу РТПА у тимектомованих мишей україн діє в усьому досліджуваному діапазоні концентрацій (від 0,01 мг/кг до 10,0 мг/кг).

Для визначення тривалості індукції синтезу РТПА у мишей в умовах тимектомії ми використовували введення препарату в концентрації 0,1 мг\кг. За контроль брали такий відомий імуномодулятор, як спленін. Дані подані на табл.2.

Таблиця 2

**$\log_2$  титру РТПА в різні строки після введення деяких імуномодуляторів тимектомованим мишам**

Групи мишей, які одержували	Години після ін'єкції						
	4	24	48	72	96	120	144
спленін	2,0	5,9	5,0	1,0	-	-	-
україн	2,5	6,0	5,0	4,0	4,0	3,0	1,5
дистильовану воду (контроль)	1,0	0,0	1,0	2,0	1,0	1,0	2,0

Встановлено, що динаміка синтезу РТПА після ін'єкції україн дещо відрізняється від такої при застосуванні іншого препарату з властивістю індукувати РТПА. Як видно, введення україн призводить до підвищення РТПА з максимальним рівнем через 24 год. після ін'єкції. Потім відбувається поступове, досить тривале зниження цього показника до рівня такого у контрольній групі тварин аж через 144 години. Спленін же має здатність до індукції синтезу РТПА з найбільшою концентрацією цих речовин в період 24-48 год, а вже через 72 год РТПА майже не визначаються.

Таким чином, під дією препарату україн *in vivo* підвищений рівень РТПА в організмі тимектомованих тварин спостерігається протягом 120 год, тоді як спленін індукує синтез РТПА в тих же умовах лише на протязі 48 годин.

Дані впливу препарату україн на синтез РТПА *in vitro* подані в табл. 3. Встановлено, що преінкубація тимоцитів та епітеліальних клітин тимуса мишей в присутності різних доз препарату україн сприяє посиленню синтезу РТПА цими клітинами в пробах, де препарат розведений в 10 та 100 разів.

Враховуючи одержані нами вище результати та дані досліджень про те, що малі дози україн проявляють імуномодулюючу дію, для подальшого вивчення ми використовували препарат в дозі 0,1 мг\кг маси. Дані впливу україн на деякі

Таблиця 3

**Вплив україн на синтез РТПА тимоцитами та епітеліальними клітинами тимуса *in vitro***

№ п/п	Інкубація клітин з	Титр РТПА	
		Тимоцити	Епітеліальні клітини
1.	середовищем 199	1:4	1:8
2.	україном, розведеним у 10 разів	1:16	1:128
3.	у 100 разів	1:128	1:32
4.	у 1000 разів	1:8	1:16

показники, що характеризують загальний стан органів імунітету тварин подані на табл. 4. Результати дослідів показують, що п'ятикратне введення україн протягом 10 діб підвищує масу селезінки і тимуса мишей (табл. 4). Останнє обумовлене збільшенням як відносної, так і абсолютної кількості Лф-клітин в органах імунної системи. Так, абсолютний та відносний вміст тимоцитів в дослідній групі збільшився відповідно до  $(124,1 \pm 25,4) \times 10^6$  та  $(2,34 \pm 0,36) \times 10^6/\text{мг}$  проти  $(37,7 \pm 11,9) \times 10^6$  та  $(0,69 \pm 0,25) \times 10^6/\text{мг}$  в контрольній групі.

Ін'єкції препарату україн сприяли підвищенню загальної кількості лейкоцитів в периферійній крові (до  $(9,62 \pm 1,36) \times 10^9/\text{л}$  проти  $(6,18 \pm 0,74) \times 10^9/\text{л}$  у контрольних тварин,  $p < 0,05$ ). При вивченні лейкограм з'ясовано, що це відбувається за рахунок значного збільшення абсолютної кількості лімфоцитів (з  $(4,04 \pm 0,43) \times 10^9/\text{л}$  до  $(6,24 \pm 0,73) \times 10^9/\text{л}$ ,  $p < 0,05$ ) та деякого підвищення абсолютної кількості інших видів лейкоцитів,  $p > 0,05$ .

Далі нами було досліджено вплив препарату україн на інші показники, що характеризують стан імунної системи організму. Дані подані на табл. 5. Встановлено, що введення мишам парату україн спричиняє збільшення у них носної та абсолютної кількості Т-лімфоцитів периферійній крові. Так, відносна кількість РУК зросла до  $(40,17 \pm 1,03) \%$  проти  $(26,39 \pm 1,1)$ , в контролі, а абсолютна – до  $(2,502 \pm 0,321) \times 10^9/\text{л}$  проти  $(1,240 \pm 0,238) \times 10^9/\text{л}$ ,  $p < 0,05$ .

Завдяки своїй здатності швидко розповсюджуватися на поверхні підложки, макрофаги проявляють максимальну адгезивність. Вирішальним значення в адгезії клітин має їх власна мембранна активність. В результаті проведених дослідів встановлено, що україн суттєво не впливає на метаболічну активність макрофагів, яку ми вимірювали по адгезії цих клітин. Відомо, що лімфоцити, які без попередньої сенсibilізації генетично здатні вбивати злоякісні клітини, клітини заражені мікроорганізмами та грибами, а також деякі інші типи клітин, одержали назву цитотоксичних клітин-кілерів (НК-клітин), які морфологічно ідентифікуються як ВГЛ [10]. В тварин, які одержували ін'єкції препарату україн нами виявлено суттєве збільшення як відносної та абсолютної кількості цих клітин в периферійній крові піддослідних тварин. Однією з функцій ВГЛ є натуральна цитотоксичність. Встановлено, що під дією препарату україн дослідній групі тварин НК-активність збільшилась до  $(198,20 \pm 17,69) \%$  проти  $(71,50 \pm 9,1)$  в контролі,  $p < 0,05$ .

Було проведено вивчення інтерферонного статусу організму нелінійних мишей після багаторазового введення препарату україн. В резу-

Таб.

**Деякі показники, що характеризують загальний стан органів імунної системи у нормальних мишей різних груп**

Показники	Група тварин	
	контрольна n=6	дослідна n=6
Маса тіла(г)	22,70 ± 1,04	18,08 ± 1,88*
Маса тимуса (мг)	39,50 ± 5,60	61,70 ± 12,40*
Індекс маси тимуса(мг\г)	1,88 ± 0,34	2,84 ± 0,50
Абс. кількість Лф-клітин в тимусі(× 10 <sup>6</sup> )	37,70 ± 11,90	124,40 ± 25,04*
Відносний вміст ЛФ-клітин в тимусі (× 10 <sup>6</sup> /мг)	0,68 ± 0,25	2,34 ± 0,36*
Маса селезінки (мг)	160,20 ± 29,90	184,30 ± 15,94
Індекс маси селезінки (мг/г)	7,44 ± 1,63	8,61 ± 0,77
Абс.кількість ЛФ-клітин в селезінці (× 10 <sup>6</sup> )	201,50 ± 47,16	214,24 ± 31,42
Відносний вміст Лф-клітин в селезінці (× 10 <sup>6</sup> /мг)	1,06 ± 0,30	1,22 ± 0,28

Примітка: \* – різниця між показниками дослідної та контрольної групи статистично виражена,  $p < 0,05$ .

проведених досліджень встановлено, що у тварин дослідної групи спостерігалось збільшення функціонального резерву імунокомпетентних інтерферонсинтезуючих клітин щодо продукції спонтанного та  $\alpha$ -інтерферону. Відомо, що останній має здатність безпосередньо активувати НК-клітини та макрофаги, стимулювати проліферацію В-лімфоцитів, тим самим впливаючи на силу гуморальної імунної відповіді.

Результати вивчення впливу препарату україн на гуморальну ланку імунної системи подані в табл. 5. Виходячи із наведених даних, можна констатувати, що препарат здатний посилювати формування первинної імунної відповіді у тварин. Після застосування україн кількість АУК в селезінці мишей збільшилась, в той час як загальна кількість клітин в органі практично не змінилась.

Таким чином, в експериментальних системах *in vivo* нами встановлено регулюючий вплив україн на ендокринну функцію тимуса, а також на здатність препарату до індукції синтезу РТПА у мишей після тимектомії та *in vitro*. Україн в дозі 0,1 мг\кг підвищує вміст лейкоцитів, лімфоцитів, кількість Т-клітин та ВГЛ в периферійній крові піддослідних тварин. Встановлена здатність препарату впливати на інтерферонсинтезуючі та антитілоутворюючі властивості клітин. Все це свідчить про наявність імуномодулюючої дії препарату. Отримані результати можна використовувати при визначенні схем терапії даним препаратом при патологічних процесах і станах, які супроводжуються розвитком вторинних імунодефіцитів, а також у онкологічних хворих, які підлягають протипухлинному лікуванню, або лікуванню, направленому на профілактику рецидивів та метастазів.

**ВИСНОВКИ**

1. Україн здатний посилювати ендокринну функцію тимуса нормальних мишей, індукувати синтез РТПА у тимектомованих мишей та *in vitro*. Дія препарату є дозозалежною.

2. Багаторазове введення препарату україн супроводжується збільшенням маси тимуса тварин в основному за рахунок підвищення як абсолютного, так і відносного вмісту лімфоїдних клітин в залозі.

3. Україн сприяє підвищенню загальної кількості лейкоцитів та кількості лімфоцитів в периферійній крові. У піддослідних тварин, які отримували препарат, майже вдвічі збільшується абсолютний вміст Т-клітин в периферійній крові, а вміст ВГЛ підвищується в 4,5 рази. За рахунок останнього зростає НК-активність спленоцитів.

4. Препарат здатний посилювати інтерферонсинтезуючі властивості імунокомпетентних клітин та виробку антитіл у відповідь на введення антигену.

5. Позитивний вплив україн на різні ланки імунної системи організму дає підставу відносити його до групи препаратів з імунотропною дією.

**Література**

1. Bach J.- F., Dardenne M. *Studies of thymic products.II.Demonstration and characterisation of circulating thymic hormones// Immunology.* 1973. – V.25, N3. – P. 353–366.

2. Ярилин А.А., Пинчук В.Г., Гриневич Ю.А. *Структура тимуса і дифференцировка Т- лимфоцитів.* К.: Наукова думка, 1996. – 248с.

3. Никольский И.С., Гриневич Ю.А., Селезнева Т.Н. *И др. Индукторная активность гуморальных факторов тимуса, спленина и левамизола// Иммунология.* – 1985. – № 4. – С. 44–48.

Таблица 5

**Вплив україн на деякі показники, що характеризують стан імунної системи організму**

Показники	Група тварин	
	контрольна	дослідна
Е-РУК, %	26,39 ± 1,03	40,17 ± 1,03*
× 10 <sup>9</sup> /л	1,240 ± 0,238	2,502 ± 0,321*
Адгезія макрофагів, од. опт. густини	0,135 ± 0,033	0,086 ± 0,013
ВГЛ, %	2,00 ± 0,32	5,17 ± 0,64*
× 10 <sup>9</sup> /л	0,12 ± 0,01	0,55 ± 0,13*
НК-активність, %	71,50 ± 9,10	198,20 ± 17,69*
Інтерферон, спонтанний	2,67 ± 0,16	3,67 ± 0,16*
α- інтерферон	7,33 ± 0,16	8,17 ± 0,32*
γ- інтерферон	7,00 ± 0,32	6,33 ± 0,16
Кількість АУК, на 10 <sup>6</sup> спленоцитів	91,00 ± 28,72	120,92 ± 43,29
всього в селезінці	14376,08 ± 421,23	26058,73 ± 1486,51*
Загальна кількість клітин в селезінці	201,50 ± 47,16	214,24 ± 31,42

Примітка: \* – різниця між показниками дослідної та контрольної групи статистично виражена, p < 0,05.

4. Зак К. П., Киндзельский Л. П., Бутенко А. К. Большие гранулодержащие лимфоциты в патологии. К.: Наукова думка, 1992. – 162 с.
5. Гордиенко С.М. Нерадиометрические методы оценки естественной цитотоксичности на эритроцитарные клетки- мишени // Иммунология, 1984. – №1. – С.31– 37.
6. Schellekens H., Stits L.W. Simple method for measuring growth inhibition by interferon of cells in monolayer // J. of Virological Methods, 1980. – №1. – P. 197–200.
7. Jerne N.K., Nordin A.A. Plaque formation in agar by single antibody- production cells // Science, 1963. – V.140 (3565). – P. 405–407.
8. Клаус Д.Ж.(ред.) Лимфоциты: Методы. М.: Мир, 1990. – 393с.
9. Бутаков А. А., Оганезов В. К., Пинегин Б. В. и др. // Спектрофотометрическое определение адгезивной способности полиморфоядерных лейкоцитов периферической крови. Иммунология, 1991. – №5. – С. 71–72.
10. Возианов А.Ф., Бутенко А.К., Зак К.П. Цитокины. Биологические и противоопухолевые свойства. К.: Наукова думка, 1998. – 315 с.

**РЕЗЮМЕ**

**ИССЛЕДОВАНИЕ ИММУНОТРОПНОЙ АКТИВНОСТИ ПРЕПАРАТА УКРАИН В ЭКСПЕРИМЕНТЕ**

**Ю.А. Гриневич, Г.Д. Бендюг, Н.Н.Храновская, С.В. Мартыненко, Г.Г. Кадьякаленко, Я. В. Новицкий**

*Институт онкологии АМН Украины, г. Киев*

В статье представлены результаты экспериментальных исследований иммуномодулирующего эффекта укрaina – препарата, содержащего алкалоиды чистотела большого и тиофосфорную кислоту. Украин усиливает эндокринную функцию центрального органа иммунной системы – тимуса у мышей и индуцирует синтез веществ с тимозиноподобной активностью у животных после тимэктомии и *in vitro*. Это влияние препарата является дозозависимым. Многократное введение препарата украин животным способствует повышению массы тимуса, в основном, за счет увеличения количества лимфоидных клеток в железе. Украин увеличивает содержание Т-лимфоцитов в периферической крови, гуморальный иммунный ответ на введенный антиген, НК-активность спленоцитов, а также влияет на интерферонсинтезирующие свойства клеток организма подопытных животных. Положительное влияние укрaina на разные звенья иммунной системы дает основание относить его к группе препаратов с иммунотропным действием.

**SUMMARY**

**INVESTIGATION OF IMMUNOTROPIC ACTIVITY OF UKRAIN IN EXPERIMENTS**

**Yu.A.Grinevich, G.D.Bendyng, N.M.Khranovska, S.V.Martinenko, G.G.Kadkalenko, J. W. Novizki**  
*Institute of Oncology AMSc. Ukraine*

The results of experimental investigation of immunomodulating effect of ukraine – preparation which contains alkaloids of celandine (*Chelidonium majus*) and thiophosphorus acid are given. Ukraine can potentiate endocrine function of central organ of the immune system – thymus in mice and induce synthesis of substances with thymosin – like activity in animals after thymectomy and *in vitro*. This effect of preparation is dose – dependent. Repeated infusion of preparation ukraine into the animals results in increase of thymic mass mainly at the expense of increase of amount of lymphoid cells in gland. Ukraine can increase content of T-lymphocytes in peripheral blood, potentiate humoral immune response on infused antigen and NK – activity of splenocytes, potentiates interferon synthesizing properties of organism cells of experimental animals. Positive effect of ukraine on various areas of the immune system can testify to the fact that it can belong to the group of preparations with immunotropic effect.