

УЧРЕЖДЕНИЕ ОБРАЗОВАНИЯ
«БЕЛОРУССКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ»

УДК 57.085.23:612.017.1:615.076 (043.3)

ДУЖ
Елена Васильевна

**КОМПЛЕКСНАЯ ОЦЕНКА *IN VITRO* БИОЛОГИЧЕСКОЙ
АКТИВНОСТИ ИММУНОМОДУЛИРУЮЩИХ ВЕЩЕСТВ**

Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

по специальности
14.03.09 – клиническая иммунология, аллергология

Минск 2023

Научная работа выполнена в государственном учреждении «Республиканский научно-практический центр эпидемиологии и микробиологии»

Научный руководитель: **Гончаров Андрей Евгеньевич**, кандидат медицинских наук, доцент, директор государственного научного учреждения «Институт биофизики и клеточной инженерии Национальной академии наук Беларуси»

Официальные оппоненты: **Потапнёв Михаил Петрович**, доктор медицинских наук, профессор, заведующий отделом клеточных биотехнологий государственного учреждения «Республиканский научно-практический центр трансфузиологии и медицинских биотехнологий»

Прокулевич Владимир Антонович, доктор биологических наук, профессор, заведующий кафедрой микробиологии биологического факультета учреждения образования «Белорусский государственный университет»

Оппонирующая организация: государственное научное учреждение «Институт физиологии Национальной академии наук Беларуси»

Защита состоится 16 марта 2023 года в 12.00 на заседании совета по защите диссертаций Д 03.18.04 при учреждении образования «Белорусский государственный медицинский университет» по адресу: 220083, г. Минск, пр-т Дзержинского, 83, e-mail: uchsovnet@bsmu.by, тел. (017) 302 16 21.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке учреждения образования «Белорусский государственный медицинский университет»

Автореферат разослан _____ февраля 2023 года.

Ученый секретарь совета
по защите диссертаций
кандидат медицинских наук, доцент



А.П. Музыченко

ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время в странах СНГ известно более 200 иммуномодулирующих лекарственных средств (ЛС), которые нашли широкое применение как в медицинской практике, так и в ветеринарии. По своей природе они делятся на препараты растительного, микробного, животного и синтетического происхождения [Р. М. Хаитов, 2020].

Важным критерием и необходимой стадией исследования на доклиническом этапе разработки новых иммуномодуляторов является оценка их иммунобиологической активности. Классический метод проведения доклинических испытаний предусматривает проведение исследований на лабораторных животных или клетках периферической крови человека, что является затратным и трудоемким процессом [К. Somanjana, 2021]. Кроме того, необходимо учитывать и повышенные требования этического характера при работе с экспериментальными животными. В связи с этим особую актуальность приобретает разработка и использование новых методов оценки иммуномодулирующей активности ЛС.

В настоящей диссертационной работе в качестве нового объекта исследования будет обоснована возможность использования для этих целей перевиваемых лимфоидных и миелоидных клеточных линий человека, которые наряду с клетками периферической крови человека характеризуются способностью отвечать на различные стимулы изменением экспрессии поверхностных и внутриклеточных молекул. Использование клеточных линий и расширение перечня клеток периферической крови человека может стать перспективным подходом для проведения доклинических испытаний при создании новых иммуномодуляторов или оценки иммуномодулирующих свойств ЛС [I. Elisia et al., 2018]. Предлагаемый нами подход оценки иммунобиологических свойств позволит оптимизировать скрининг для отбора наиболее перспективных ЛС с иммуномодулирующим действием.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Связь работы с крупными научными программами и темами

Тематика диссертационной работы полностью соответствует пп. 3.2 и 4.4 перечня приоритетных направлений научных исследований Республики Беларусь на 2011–2015 годы и п. 4 на 2016–2020 годы. Диссертационная работа выполнена в рамках задания 1.12 «Создать банк линий клеток человека и разработать комплексный метод их применения для тестирования лекарственных средств подгруппы иммуностимуляторов» межгосударственной целевой программы Евразийского экономического сообщества «Инновационные биотехнологии» на 2011–2015 гг., подпрограммы 1 «Инновационные

биотехнологии в Республике Беларусь» (№ гос. регистрации 20142774 от 29.10.2014, сроки выполнения 2014–2015 гг.).

Цель и задачи исследования

Цель исследования: научно обосновать использование клеточных линий для оценки иммунобиологических свойств ЛС на основе изучения иммунофенотипических характеристик перевиваемых лимфоидных и миелоидных линий клеток.

Задачи исследования:

1. Охарактеризовать Т-клеточные, В-клеточные и миелоидные перевиваемые линии клеток по экспрессии иммунологически значимых поверхностных и внутриклеточных молекул, оценить их отвечаемость на активирующие стимулы для обоснования выбора наиболее подходящих культур в скрининге веществ с потенциальными иммуномодулирующими свойствами.

2. Разработать метод получения фенотипически дифференцированных моноцитарных дендритных клеток (ДК) человека с использованием комбинации цитокинов гранулоцитарно-моноцитарного колониестимулирующего фактора (ГМ-КСФ) и интерферона-альфа (ИНФ- α) и оценить их способность к изменению фенотипа под действием ЛС.

3. Разработать экспериментальные модели *in vitro*, позволяющие оценить влияние веществ с потенциальными иммуномодулирующими свойствами на Т-клетки, В-клетки, ДК и нейтрофилы периферической крови человека.

4. Изучить закономерности изменения иммунофенотипа перевиваемых клеток при воздействии ЛС различных групп в экспериментальных моделях *in vitro*.

5. Определить в условиях *in vitro* иммунофенотипические изменения клеточных линий под действием водных экстрактов гриба *Boletus edulis* в сравнении с хорошо изученными *Ganoderma lucidum*, *Lentinula edodes* с целью оценки их иммуномодулирующих свойств.

Объект исследования: перевиваемые клеточные линии человека лимфоидного и миелоидного происхождения, культуры моноцитарных ДК, образцы периферической крови доноров, ЛС и вещества различного происхождения с потенциальными иммуномодулирующими свойствами.

Предмет исследования: сравнительный анализ антигенного профиля Т-, В-клеточных и миелоидных линий клеток, клеток периферической крови человека и их отвечаемости на активационные стимулы различной природы, иммунобиологическая активность иммуномодулирующих ЛС и методы ее оценки в условиях *in vitro*.

Научная новизна

Впервые детально охарактеризован антигенный профиль 19 перевиваемых линий клеток: С-8166, СЕМ-SS, СЕМ-NK^R, Molt-3, Molt-4, Molt-4 клон 8, Jurkat,

Jurkat-tat, MT-2, MT-4, Daudi, IM-9, Raji, RPMI-1788, U-937, THP-1, KG-1, HL-60 и CCRF-SB.

Разработан комплексный метод оценки биологической активности (с позиции влияния на систему иммунитета) иммуномодулирующих ЛС с использованием перевиваемых культур клеток и лейкоцитов периферической крови человека. Получен патент № 22781 «Способ выявления *in vitro* иммунобиологической активности лекарственного средства», в котором изложен метод тестирования иммуномодулирующих ЛС, разработанный в ходе выполнения диссертационной работы.

Проведена оценка изменения иммунофенотипа перевиваемых клеточных линий под действием ЛС различных классов, обладающих иммуномодулирующим действием.

Показана способность водного экстракта гриба *Boletus edulis* оказывать активирующее действие на клетки системы иммунитета, что предполагает возможность использования препарата на его основе в качестве иммуномодулирующего ЛС.

Положения диссертации, выносимые на защиту:

1. Иммунофенотипическая характеристика Т-клеточных (С-8166, СЕМ-SS, СЕМ-NK^R, Molt-3, Molt-4, Molt-4 клон 8, Jurkat, Jurkat-tat, MT-2, MT-4), В-клеточных (Daudi, IM-9, CCRF-SB, Raji, RPMI-1788) и миелоидных (THP-1, KG-1, HL-60 и U-937) перевиваемых линий клеток человека по экспрессии поверхностных и внутриклеточных молекул (популяционные маркеры, транскрипционные факторы, регуляторные белки, цитокины, маркеры антигенпредставления и костимуляции, молекулы активации, адгезии) позволяет проводить их корректный подбор для исследований *in vitro* в области иммунологии и иммунофармакологии. Определение иммунофенотипа перевиваемых линий клеток Jurkat-tat, MT-2, Daudi и THP-1, а также интерферон- α -индуцированных ДК является информативным подходом на скрининговом этапе оценки иммуномодулирующих свойств лекарственных средств различного происхождения.

2. Установлено, что с целью скрининга иммуномодулирующих свойств ЛС и кандидатных препаратов может быть использована комплексная характеристика изменения иммунофенотипа и функции перевиваемых клеточных линий, включающая оценку экспрессии молекул CD32, CD80, CD197, CD205 и HLA-DR, продукции интерлейкина-12, показателей жизнеспособности и апоптоза ДК; определение продукции активных форм кислорода (АФК) и оценку фагоцитоза флуоресцентно-меченых бактерий нейтрофилами, определение экспрессии молекулы CD69 и продукции фактора некроза опухолей- α клетками Jurkat-tat; оценку экспрессии молекул CD80 и HLA-DR, показателей жизнеспособности и апоптоза клеток линии Daudi.

3. Лекарственные средства на основе пробиотических штаммов бактерий рода *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Enterococcus*, *Streptococcus*, *Staphylococcus*, *Klebsiella* и их *рибосомальных фракций* обладают выраженными стимулирующими свойствами, что проявляется усилением поверхностной экспрессии CD32, CD80, CD205, HLA-DR, продукции АФК и ИЛ-12 на ДК, а также изменением экспрессии молекул CD80 и HLA-DR на поверхности В-клеток.

Лекарственное средство на основе инозина пранобекса усиливает экспрессию молекулы HLA-DR на В-клетках и экспрессию молекул CD205, HLA-DR и продукцию ИЛ-12 на ДК. Лекарственные средства синтетического и растительного происхождения (на основе умифеновира, азоксимера бромид, высокомолекулярного соединения на основе полифенола глюкозаминилмурамилдипептида и сока травы эхинацеи), тимического происхождения (альфа-глутамил-триптофана, комплекса полипептидов, выделенных из тимуса крупного рогатого скота) не вызывают достоверного изменения иммунофенотипа использованных перевиваемых клеточных линий.

4. Водный экстракт гриба *Boletus edulis* обладает более выраженными иммуномодулирующими свойствами в сравнении с *Ganoderma lucidum*, *Lentinula edodes*, что проявляется в усилении продукции АФК нейтрофилами, моноцитами и ДК, усилении экспрессии CD205 на ДК, повышении экспрессии CD69 на Т-лимфоцитах линии Jurkat-tat и CD86 на В-клетках линии Daudi, а также увеличении экспрессии маркера активации CD203c и молекул дегрануляции CD63 и CD107a базофилами.

Личный вклад соискателя

Выбор направления исследования, постановка цели и задач исследования, планирование экспериментов, анализ полученных результатов, формулировка выводов, а также подготовка и написание научных публикаций печатных работ, осуществлялись совместно с научным руководителем. Экспериментальный материал получен автором самостоятельно. Выбор методов исследования, условий экспериментов, иммунофенотипический анализ, интерпретация результатов, анализ данных, статистическая обработка данных и оформление результатов диссертационного исследования проведены при решающем участии автора. Автор выражает благодарность канд. биол. наук Голубевой Марине Брониславовне и д-ру мед. наук, проф. Еремину Владимиру Федоровичу за методическую помощь при культивировании суспензионных культур клеток.

Апробация результатов диссертации

Результаты исследований были представлены на: Республиканском семинаре «Современные методы исследования в клинической и экспериментальной иммунологии и аллергологии» (г. Минск, 30.10.2015), European Academy of Allergy and Clinical Immunology Congress 2016 (г. Вена, Австрия, 11–15.06.2016), 2016 Annual Scientific Meeting of the Allergy, Asthma

and Immunology (г. Сан Франциско, США, 10–14.11.2016), European Academy of Allergy and Clinical Immunology (EAACI) Congress 2017 (г. Хельсинки, Финляндия, 17–21.06.2017), European Academy of Allergy and Clinical Immunology Congress 2018 (г. Мюнхен, Германия, 26–30.05.2018), Республиканской научно-практической конференции «Новые концепции и методы в микробиологии, вирусологии и иммунологии» (13.12.2018, Минск, Беларусь), 6th Ukrainian Congress for Cell Biology with international representation Yaremche, recreation center «Arnika» Ivano-Frankivsk National Medical University (г. Яремче, Украина, 18–21.06.2019).

Результаты исследования внедрены в научно-практическую деятельность Института биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси и Республиканского научно-практического центра эпидемиологии и микробиологии.

Опубликование результатов диссертации

По теме диссертационной работы опубликовано 15 печатных работ: 4 статьи в рецензируемых научных журналах, соответствующих пункту 19 Положения о присуждении ученых степеней и присвоении ученых званий в Республике Беларусь, 5 статей в сборниках научных трудов и 5 тезисов докладов, 1 патент на изобретение. Общий объем опубликованных материалов составляет 5,9 авторских листа, из них на статьи в рецензируемых журналах приходится 3,0 авторских листа.

Структура и объем диссертации

Диссертация состоит из введения, общей характеристики работы, аналитического обзора литературы (глава 1), материалов и методов исследований (глава 2), основных результатов исследований (главы 3–5), заключения, библиографического списка и приложения. Работа изложена на 169 страницах, содержит 74 таблицы и 36 рисунков. Список цитируемой литературы включает 221 источник и 15 публикаций автора.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материалы и методы исследования

Дизайн исследования представлен на рисунке 1.

Материалы: объектами исследований служили 19 иммортализованных перевиваемых лимфоидных и миелоидных клеточных линий человека, образцы периферической крови здоровых лиц (n=47), культуры моноцитарных ДК (n=59). ЛС с доказанным иммуномодулирующим действием: Бронхо-мунал, Линекс, Рибомунил, Ликопид, Гроприносин, Иммунал, Тимоген, Тималин, Арбидол, Кагоцел, Полиоксидоний, галеновые препараты: водные экстракты грибов *Boletus edulis*, *Ganoderma lucidum*, *Lentinula edodes*.

Методы. Для приготовления растворов исследуемых ЛС и веществ использовали лиофилизаты, суспензию бактерий либо таблетки. Концентрированные растворы исследуемых веществ и ЛС были приготовлены

с учетом информации об их растворимости: на ДМСО, этиловом спирте или DPBS (pH=7,2).

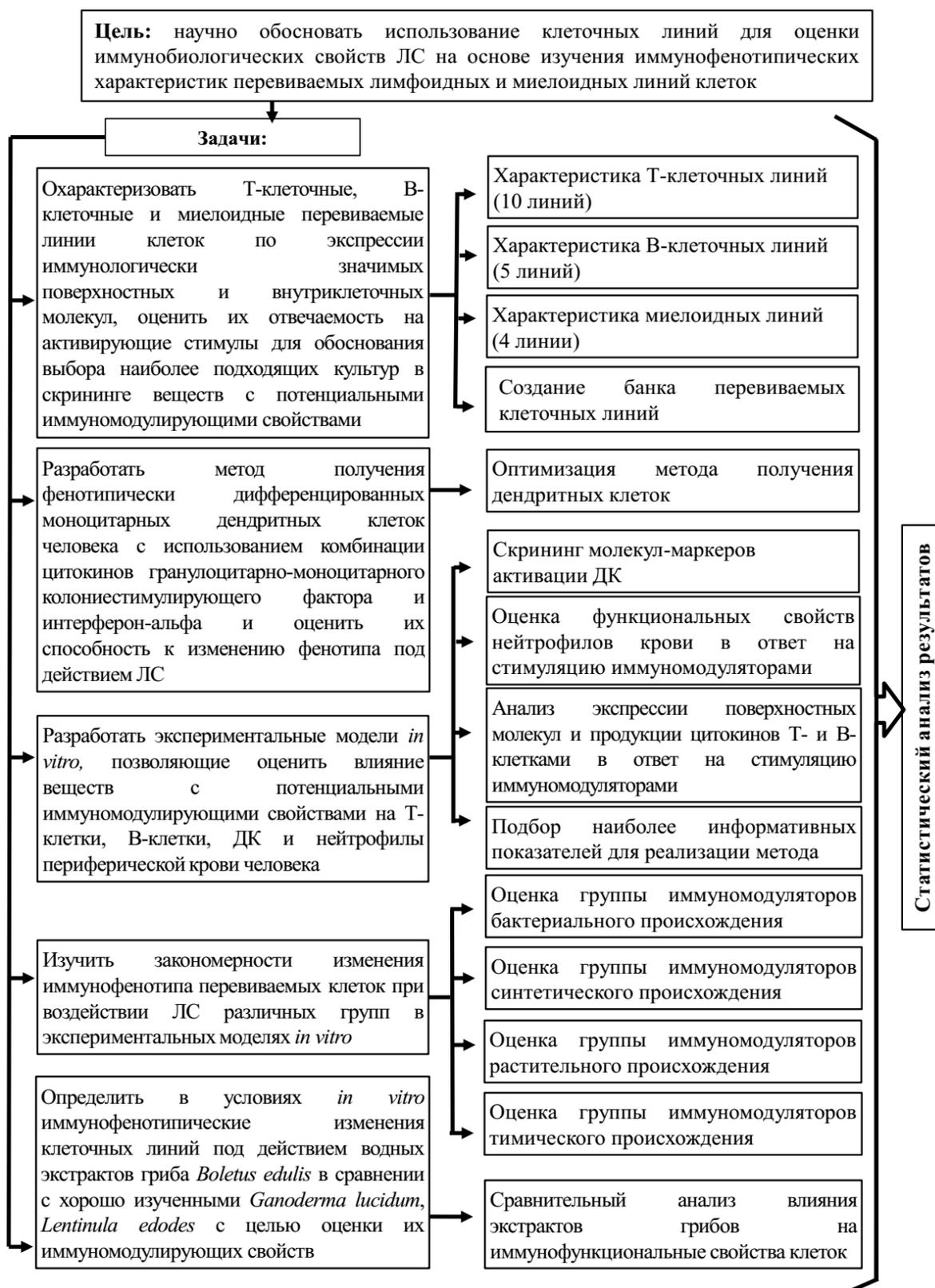


Рисунок 1. – Дизайн исследования

Мононуклеары периферической крови выделяли из образцов венозной крови здоровых лиц методом центрифугирования на градиенте фиколл-пак с плотностью 1077 г/л. Моноциты получали методом адгезии к пластику

[А.Е. Гончаров, 2013]. Незрелые ДК получали из моноцитов крови с использованием ГМ-КСФ и ИНФ- α , который вызывает ускоренную дифференцировку ДК в течение 4-х суток.

Для оценки функции нейтрофилов методом проточной цитометрии использовали цельную кровь здоровых лиц с антикоагулянтом.

Инкубацию клеточных линий с исследуемыми веществами проводили в течение 24 часов при 3–6-кратных повторях экспериментов [А.А. Шеряков и др., 2012]. Взвесь культуры ДК, клеточные линии Daudi и Jurkat-tat и нейтрофилы периферической крови разливали по лункам 6-луночного планшета. В лунки помещали следующие клеточные культуры и вещества: лунка 1 (отрицательный контроль) – взвесь клеток Daudi, Jurkat-tat, нейтрофилы крови или ДК в DPBS; лунка 2 (положительный контроль) – липополисахарид (ЛПС) для ДК и клеток линии Daudi, ИЛ-2 и форбол-12-миристан-13-ацетат (ФМА) для Jurkat-tat. Лунки 3 и 4 – рабочие растворы исследуемого ЛС. Для исследования использованы 2 концентрации ЛС. При выборе концентраций иммуномодулирующих ЛС (таблица 1) для культивирования с клеточными линиями следовали руководству по проведению доклинических исследований ЛС [А. Н. Миронов и др., 2012].

Таблица 1. – Перечень лекарственных средств, использованных в исследовании

Действующее вещество	Торговое наименование	Использованные концентрации	
		Концентрация 1	Концентрация 2
1. ЛС на основе лиофилизированного лизата бактерий	Бронхо-мунал	0,07 мг/мл	0,7 мг/мл
2. ЛС на основе живых лиофилизированных бактерий	Линекс	0,28 мг/мл	28 мг/мл
3. Инозин пранобекс	Гроприносин	5 мг/мл	50 мг/мл
4. Умифеновир	Арбидол	1 мг/мл	10 мг/мл
5. Азоксимера бромид	Полиоксидоний	0,5 мкг/мл	5 мкг/мл
6. ЛС на основе экстракта тимуса крупного рогатого скота	Тималин	0,1 мг/мл	1 мг/мл
7. β -глутамил-триптофан (натриевая соль)	Тимоген	0,25 мкг/мл	2,5 мкг/мл
8. Высокомолекулярное соединение на основе полифенола	Кагоцел	0,12 мг /мл	1,2 мг/мл
9. ЛС на основе рибосом и клеточных мембран возбудителей респираторных инфекций	Рибомунил	0,75 мкг /мл	75 мкг/мл
10. Глюкозаминилмурамилдипептид	Ликопид	10 мкг	100 мкг
11. Сок травы эхинацеи пурпурной (<i>Echinacea purpurea</i>)	Иммунал	2 мкл/мл	8 мкл/мл

Для получения водного экстракта грибов высушенные измельченные плодовые тела грибов (200 мг) добавляли к 4 мл бидистиллированной воды. Суспензию выдерживали 30 минут при комнатной температуре, затем нагревали на водяной бане до 90°C. Полученный экстракт центрифугировали

для осаждения нерастворенных веществ и стерилизовали фильтрацией через фильтры с диаметром пор 0,22 мкм [Е.О. Костромина, 2014]. Иммунофенотипирование клеток методом проточной цитометрии проводили по стандартной методике с использованием антител, меченых флуорохромами, с применением проточного цитофлуориметра FACSCalibur (Becton Dickinson, США). Учитывали относительное количество клеток в популяции, экспрессирующих определяемые молекулы и относительную интенсивность флуоресценции (ОИФ) этих молекул.

Фагоцитарную активность моноцитарных ДК и нейтрофилов периферической крови определяли при помощи FITC-меченых бактерий. Определение продукции АФК нейтрофилами периферической крови и моноцитарными ДК осуществляли с использованием флуоресцирующего зонда дигидрородамина (DHR123) с последующим учетом результатов на проточном цитометре [Л.П. Титов и др., 2013].

Статистическую обработку полученных данных выполняли с использованием программного обеспечения «Statistica» версия 10–12 («StatSoft», США), «StatPlus» 4.9 («AnalystSoft», США). Значения показателей представлены в виде среднего значения со стандартным отклонением и в виде медианы с интерквартильным размахом (25-й и 75-й процентиля). Нормальность распределения величин оценивали с использованием W-критерия Шапиро–Вилка. Для сравнения трех и более групп независимых данных был использован метод рангового анализа вариаций Краскела–Уоллиса. Для сравнения двух независимых выборок использовали U-критерий Манна–Уитни. Кластерный анализ проводили при помощи метода k-средних [О.Ю. Реброва, 2002].

Основные результаты и их обсуждение

Характеристика культур клеток, используемых для тестирования иммуномодулирующих свойств лекарственных средств

В процессе исследования оптимизировали условия культивирования и криоконсервации Т-, В- и миелоидных клеточных линий. Каждая из культур представляет собой популяцию округлых клеток, которые в процессе роста находились в суспензионном состоянии. Клетки образуют агрегаты при продолжительных (более 3–5 суток) сроках культивирования (рисунок 2).

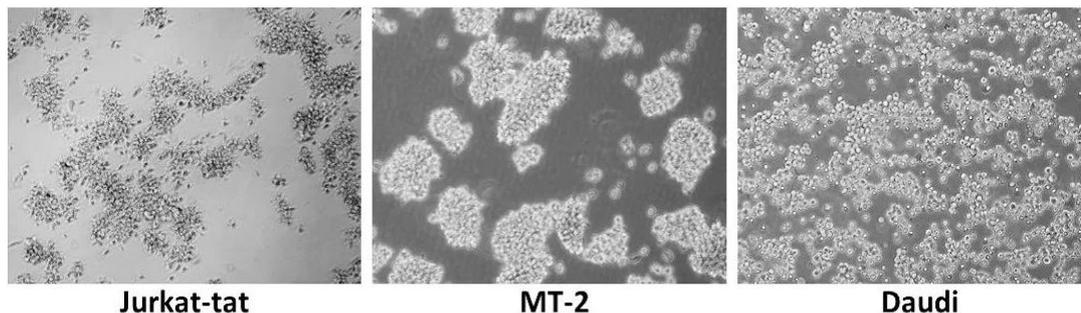


Рисунок 2. – Микрофотографии линий клеток (увеличение 100×)

Иммунофенотип клеточных линий. С целью отбора наиболее подходящих культур для тестирования иммуномодуляторов был проведен сравнительный анализ иммунофенотипа 10 перевиваемых Т-лимфоцитарных клеточных линий, 5 линий В-лимфоцитарного происхождения и 4 миелоидных линий.

Проведена оценка экспрессии поверхностных молекул Т-лимфоцитарных линий клеток. Затем выполнен кластерный анализ групп однородных молекул, в соответствии с которым Т-клеточные линии были разделены на 3 кластера. В первый кластер вошли клеточные линии МТ-2 и МТ-4, во второй кластер – линии СЕМ-SS, СЕМ.NKR, Molt-3, Molt-4, Molt-4 клон 8, Jurkat и Jurkat-tat; к третьему кластеру отнесена культура С8166 (рисунок 3).

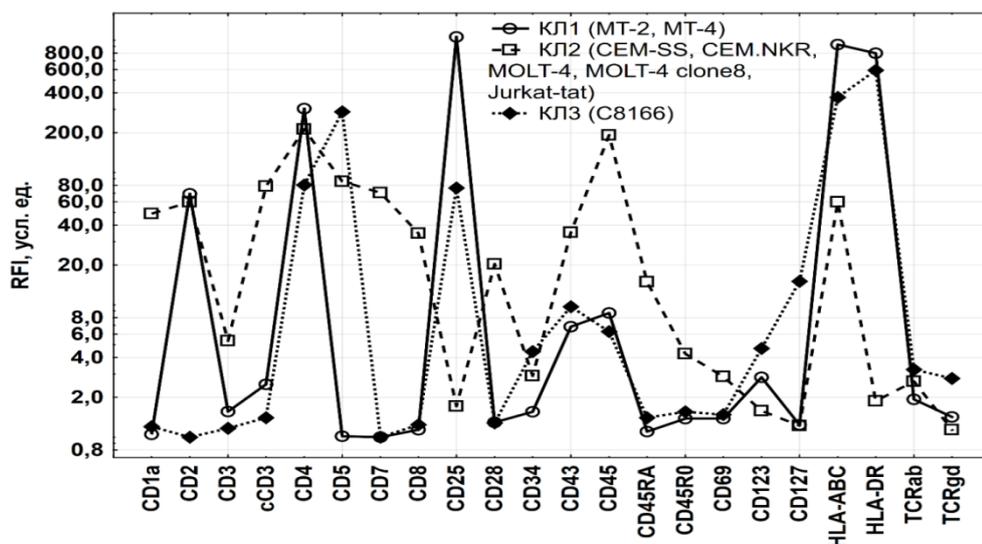


Рисунок 3. – Кластерный анализ перевиваемых линий Т-клеток

Результаты кластерного анализа позволили выбрать из всех Т-клеток линии Jurkat-tat и МТ-2, как наиболее подходящие для исследования иммуномодулирующих ЛС. Выбор Jurkat-tat обусловлен наличием экспрессии важнейших для функции Т-клеток молекул: CD1a, CD4, CD28, CD184, высоким уровнем цитоплазматической и поверхностной экспрессии молекулы CD3. Выбор линии клеток МТ-2 связан с высоким уровнем экспрессии рецептора к ИЛ-2 – CD25, маркеров CD4, CCR7, HLA-ABC, HLA-DR.

Все В-клеточные линии (Daudi, CCRF-SB, IM-9, Raji, RPMI-1788) были охарактеризованы по экспрессии поверхностных антигенов. Из всех В-лимфоцитарных линий выбрана линия Daudi, экспрессирующая наиболее полный набор молекул, характерный для зрелых В-лимфоцитов человека.

Из миелоидных линий (HL-60, U-937, THP-1 и KG-1) выбрана линия THP-1, экспрессирующая наиболее полный набор молекул распознавания, адгезии и антигенпредставления, необходимых для осуществления иммуноопосредованного ответа на вещества, включая ЛС с иммуотропным действием.

Дифференцировка миелоидных линий. Клеточные линии THP-1, HL-60, KG-1 культивировали с ФМА и цитокинами (GM-CSF, ИЛ-4, TGF, ИЛ-10, TNF- α)

для оценки возможности их дифференцировки в макрофагоподобные клетки. После сравнительного анализа фенотипических данных исходной линии ТНР-1, имеющей фенотип незрелых моноцитов, и ТНР-1, дифференцированных в макрофаги, было установлено, что дифференцированные клетки приобрели адгезивные свойства и повышенную экспрессию молекул CD14, CD16, CD80, CD86 и CD209. Дальнейший анализ иммунофенотипа показал, что линия ТНР-1, дифференцированная в макрофагоподобные клетки под действием ФМА вместе с различной комбинацией цитокинов (ИЛ-4, ИЛ-10, TGF, TNF- α), не изменяла достоверно экспрессию индикаторных молекул (CD1a, CD14, CD209). Нами не выявлено достоверных изменений иммунофенотипа линий клеток HL-60 и KG-1 под действием ФМА и цитокинов, что свидетельствует о низком потенциале этих клеточных линий к дифференцировке.

Для оптимизации метода получения ДК сравнили 6 питательных сред (AIM-V®, StemSpan™ SFEM, CellGro® DC, X-VIVO™ 15, DMEM/F-12, RPMI-1640) и выбрали RPMI-1640 в качестве наиболее подходящей среды для получения функционально полноценных ДК. При помощи цитокинового «коктейля», включающего ГМ-КСФ и ИНФ- α на 4-е сутки инкубации *in vitro* были получены частично зрелые ИНФ- α -индуцированные ДК, которые характеризуются высокой экспрессией CD80 и CD83.

Комплексный метод оценки влияния иммуномодуляторов на функциональную активность иммунокомпетентных клеток. Для адаптации разработанного метода исследования проводили с использованием ЛС, зарегистрированных в Республике Беларусь (см. табл. 1).

Оценка функциональной активности нейтрофилов. При культивировании ЛС № 1, 2, 9 на основе бактерий и их компонентов отмечалось усиление интенсивности фагоцитоза с нейтрофилами периферической крови в сравнении с контролем без ЛС ($p < 0,01$). Исследование других ЛС показало отсутствие значимых изменений интенсивности фагоцитоза нейтрофилами ($p > 0,05$).

Доля нейтрофилов, продуцирующих АФК *in vitro* без стимуляции, составила 5,0 (3,0–6,0) %. При инкубации нейтрофилов с ФМА число клеток, продуцирующих АФК, достигало 100 %. ЛС № 1, 2, 9 усилили способность к стимуляции респираторного взрыва (>80 %) ($p < 0,03$). Остальные ЛС не оказали статистически значимого влияния на ФМА-индуцированную продукцию АФК нейтрофилами ($p > 0,05$).

Оценка влияния иммуномодулирующих ЛС на антигенпредставляющие клетки. Жизнеспособность ДК при культивировании в течение 18–24 часов со всеми из исследованных ЛС (см. табл. 1) составила более 90 %, а доля клеток в состоянии апоптоза к концу культивирования не превышала 5,7 %.

Незрелые ДК слабо продуцировали АФК (медианное значение – 10,9 (9,8–14,0) %) позитивных клеток. ЛПС и ЛС № 1, 2 усиливали продукцию АФК

до 66–76 %, в то же время ЛС № 3 в двух концентрациях не оказывало существенного влияния на данный показатель. Процент продуцирующих ИЛ-12 клеток в контроле составил 1,2 (0,9–1,8) %, а при активации с ЛПС – 19,2 (17,5–25,1) %. В то же время культивирование ДК в присутствии ЛС № 1, 2, 9 привело к увеличению продукции ИЛ-12 на 15 % и более ($p < 0,05$ с контролем), а при культивировании ДК в присутствии ЛС № 3 (обеих использованных концентраций) продукция ИЛ-12 возросла до 5,6 % ($p = 0,009$ с контролем).

Интенсивность экспрессии молекулы CD80 на ДК в присутствии ЛС № 1, 2, 9 увеличивалась в сравнении с контролем в 2–3 раза ($p < 0,05$). ЛС № 4 в обеих концентрациях способствовало достоверному снижению содержания CD197 (CCR7)⁺ ДК в культуре ($p = 0,016$ и $p = 0,009$) соответственно. Установлено, что интенсивность экспрессии CD32 на ДК, стимулированных ЛПС и ЛС на основе бактерий и их компонентов (ЛС № 1, 2, 9) было достоверно выше по сравнению с контролем ($p < 0,01$).

Выявлено увеличение интенсивности экспрессии молекулы CD205 при культивировании ДК с ЛПС – 178,2 (150,4–190,2) усл. ед., в контроле без ЛПС – 90,7 (80,0–94,0) усл. ед. ($p < 0,05$). При культивировании ДК с ЛС № 1 ($p = 0,01$), ЛС № 2 ($p = 0,016$) и ЛС № 9 ($p = 0,012$) выявлено достоверное повышение интенсивности экспрессии CD205. Количество ДК, экспрессирующих CD205 при культивировании с ЛС № 3, также были достоверно выше по сравнению с контролем ($p = 0,028$).

При инкубации ДК с ЛС № 1, 2 выявлено увеличение интенсивности экспрессии CD282 (TLR2) на ДК ($p < 0,05$), также установлены достоверные различия содержания молекулы CD284 на ДК, индуцированных ЛПС ($p = 0,036$), ЛС № 1 ($p = 0,045$) и ЛС № 2 ($p = 0,016$).

Культивирование ДК с ЛПС приводило к увеличению интенсивности экспрессии HLA-DR в 2 раза в сравнении с контролем. ЛС № 1, 2, 9 достоверно усиливали экспрессию молекулы HLA-DR на ДК ($p < 0,05$). Инкубация ДК с ЛС № 3 приводила к усилению интенсивности экспрессии молекулы почти в 1,5 раза ($p < 0,01$).

Культивирование ДК с ЛПС и ЛС № 1–3 достоверно приводило к усилению интенсивности экспрессии CD83 на поверхности клеток ($p < 0,05$).

Следует отметить, что не более 10 % незрелых ДК в контроле экспрессировали молекулу CD208. При этом культивирование ДК с ЛПС и ЛС № 1, 2 способствовало усилению интенсивности экспрессии молекулы CD208 в 8 раз и более ($p < 0,01$).

Оценка иммуномодулирующего действия ЛС на T-клеточную линию Jurkat-tat. Стимуляция клеток с помощью ИЛ-2 и ФМА вызывала активацию более 75 % клеток, идентифицируемых как CD69⁺ Т лимфоциты. ЛС № 1, 2 и 9 во всех концентрациях способствовали увеличению экспрессии молекулы CD69

клетками линии Jurkat-tat ($p < 0,01$) по отношению к контролю. Инкубация с ЛС № 3–11, включая ЛС тимического происхождения, не привела к увеличению числа $CD69^+$ Т-клеток. Увеличение продукции ФНО- α Jurkat-tat клетками вызывали лишь ЛС микробного происхождения (ЛС № 1, 2 и 9) ($p < 0,01$).

Оценка иммуномодулирующего действия ЛС на В-клетки линии Daudi. Установлено, что ЛПС, а также ЛС № 1, 2 и 9 достоверно увеличивали процент клеток линии Daudi, экспрессирующих костимулирующий маркер CD80. Кроме того, ЛПС и ЛС № 1, 2, 9 на основе бактерий и ЛС № 3, способствовали усилению интенсивности экспрессии молекулы HLA-DR клетками линии Daudi. Жизнеспособность Daudi составила более 90 %, а количество клеток в состоянии апоптоза не превышала 7 %.

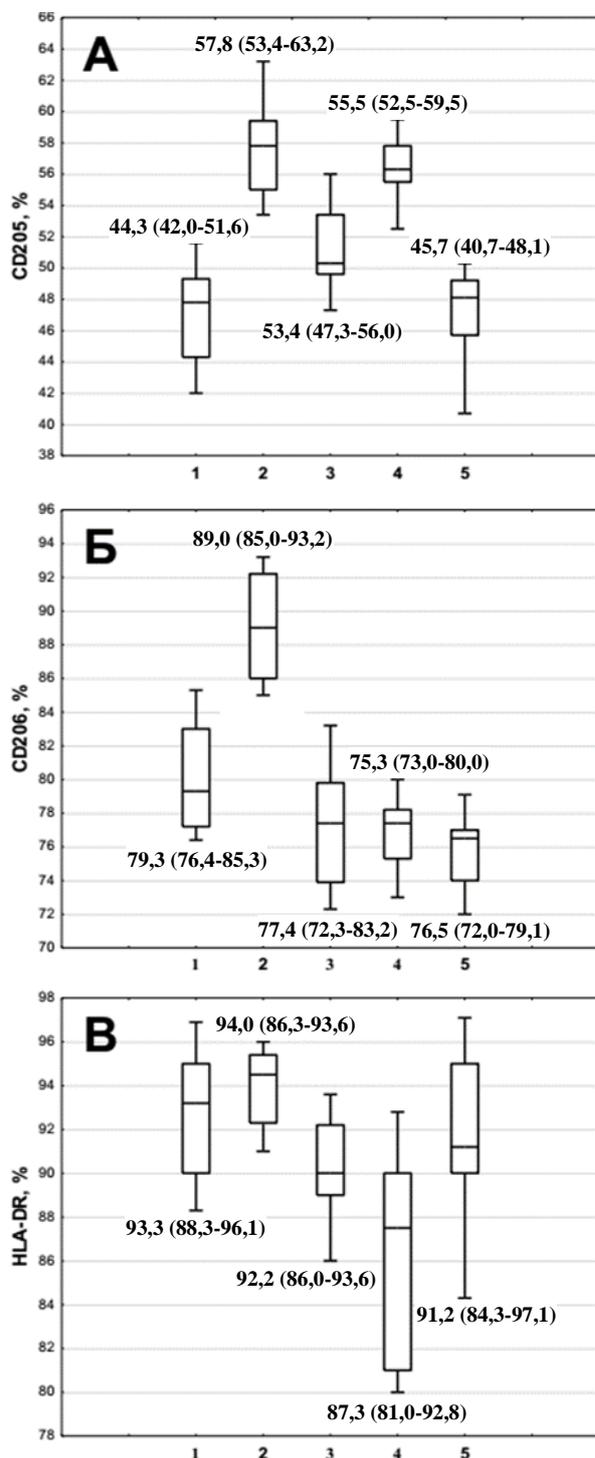
Оценка иммуномодулирующего действия ЛС на клетки миелоидного происхождения THP-1. Проведенный иммунофенотипический анализ не выявил различий экспрессии молекул CD14, CD32, CD80, CD282, CD284 на миелоидных клетках линии THP-1, индуцированных ФМА, при дополнительном внесении исследованных ЛС. При оценке экспрессии toll-like рецепторов: CD282 (TLR2), CD284 (TLR4) также не было отмечено статистически значимых изменений экспрессии исследованных молекул на клетках THP-1 после инкубации с ЛС № 1–3 в различных концентрациях ($p > 0,1$). Полученные результаты исследования показали, что нецелесообразно использовать линию THP-1, индуцированную ФМА, для выявления иммуномодулирующей активности ЛС, в связи с ее неспособностью активно отвечать на активационные стимулы.

Комплексный метод оценки in vitro иммуномодулирующей активности биологически активных веществ и ЛС. Схематично представлен разработанный алгоритм исследования, включающий культивирование исследуемых ЛС с ДК, нейтрофилами, клетками линий Daudi и Jurkat-tat с последующей оценкой экспрессии ряда наиболее информативных поверхностных и внутриклеточных молекул, оценкой фагоцитарной активности и продукции АФК (рисунок 4).



Рисунок 4. – Алгоритм исследования *in vitro* иммуномодулирующих свойств лекарственных средств

Дальнейшим этапом работы было сравнение иммуномодулирующего эффекта экстрактов трех видов грибов на клетки Jurkat-tat, Daudi, ДК, моноциты, нейтрофилы, базофилы и ЕК-клетки периферической крови.



1 – отрицательный контроль, 2 – ЛПС, 3 – *B. edulis*, 4 – *G. lucidum*, 5 – *L. edodes*

Рисунок 5. – Показатели экспрессии молекул:

А – CD205, Б – CD206, В – HLA-DR ДК при культивировании с водными экстрактами грибов

Количество нейтрофилов, продуцирующих АФК в присутствии грибных экстрактов, достоверно увеличивалось по сравнению с контролем. Экстракт *B. edulis* усиливал продукцию АФК нейтрофилами до 20 % позитивных клеток, а *G. lucidum* и *L. Edodes* – более 10 % ($p = 0,031$ и $p = 0,04$ в сравнении с контролем). ЛПС и все водные грибные экстракты также индуцировали продукцию АФК моноцитами (70–90 % позитивных клеток).

При культивировании ДК с экстрактами *G. lucidum* или *L. edodes* значения показателя интенсивности продукции АФК не различались достоверно между собой ($p > 0,05$), но при этом продукция АФК увеличилась в два раза ($p = 0,037$ и $p = 0,04$ соответственно) по сравнению с контролем. Продукция АФК ДК, индуцированными *B. edulis*, была сравнима (>90 % позитивных клеток) с другими грибными экстрактами ($p = 0,029$).

При культивировании ДК с ЛПС, *B. edulis* или *L. edodes* было выявлено усиление экспрессии CD205 ($p < 0,05$). Интенсивность экспрессии молекулы CD206 и HLA-DR достоверно не изменилась при культивировании ДК с ЛПС и исследуемыми видами грибных экстрактов (рисунок 5).

При анализе иммунофенотипа клеток Jurkat-tat, культивированных с экстрактами грибов, показано усиление экспрессии молекулы CD69 в разной степени по сравнению с контролем

($p < 0,02$). Высокий уровень экспрессии CD69 на клетках Jurkat-tat наблюдался при их культивировании с экстрактом грибов *B. edulis* или *G. lucidum* ($>40\%$ и $>30\%$ соответственно, $p = 0,01$ и $p = 0,021$ по сравнению с контролем).

При культивировании Jurkat-tat с экстрактом гриба *L. edodes* экспрессия CD69 не превысила 15% ($p > 0,05$ с контролем). Экспрессия HLA-DR достоверно не изменялась.

Под воздействием водных экстрактов грибов *G. lucidum* или *L. edodes* на В-клеточную линию Daudi наблюдалось усиление экспрессии CD86 по сравнению с контролем ($5,4$ ($4,1-6,7$)%) ($p < 0,023$ и $p < 0,042$ соответственно), а под воздействием *B. edulis* уровень экспрессии молекул CD86 на клетках Daudi – $38,6$ ($35,1-42,6$)% ($p = 0,012$) практически в два раза превысил показатели с ЛПС ($20,5$ ($19,5-23,8$)%). Не выявлено отличий в экспрессии HLA-DR при культивировании ДК в присутствии ЛПС или грибными экстрактами.

Культивирование базофилов периферической крови с ФМА ($p = 0,009$) или *B. edulis* ($p = 0,015$) достоверно повышало интенсивность экспрессии молекулы активации CD203c ($p < 0,05$) на базофилах. При культивировании с экстрактом грибов *G. lucidum* или *L. edodes* на базофилах наблюдалось усиление экспрессии CD203c в 8 и более раз по сравнению с контролем ($p = 0,041$ и $p = 0,032$ соответственно). Экспрессия молекулы дегрануляции CD63 значительно усилилась после активации базофилов под действием водных экстрактов грибов *B. edulis* – $52,5$ ($42,7-55,3$)% ($p = 0,03$), *G. lucidum* – $33,7$ ($32,3-35,3$)% ($p = 0,025$) или *L. edodes* – $23,9$ ($23,7-24,7$)% ($p = 0,031$), по сравнению с нестимулированными базофилами – $8,6$ ($5,7-11,7$)%. Отмечалось усиление экспрессии CD107a как базофилами, инкубированными с ФМА, так и с экстрактами грибов *G. lucidum* или *L. edodes* ($p = 0,019$ и $p = 0,034$ соответственно с контролем). Максимальный уровень экспрессии CD107a наблюдался под действием *B. edulis* по сравнению с контролем более чем в 2 раза ($p = 0,012$).

При оценке влияния водных экстрактов грибов *B. edulis*, *G. Lucidum*, *L. edodes* на естественные киллерные клетки (ЕКК) периферической крови не выявлено изменение экспрессии молекулы CD16 и активационной молекулы CD336 на поверхности ЕКК.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Основные научные результаты диссертации

1. Охарактеризованы Т-клеточные, В-клеточные и миелоидные перевиваемые линии клеток по экспрессии поверхностных и внутриклеточных молекул (популяционные маркеры, транскрипционные факторы, регуляторные белки, цитокины, маркеры антигенпредставления и костимуляции, молекулы активации, миграционной способности, адгезии). Создан банк лимфоидных и миелоидных перевиваемых клеточных линий человека. Полученные результаты иммунофенотипирования и определения функциональных свойств

клеточных линий позволили идентифицировать клетки линий Jurkat-tat, МТ-2, Daudi и ТНР-1 в качестве наиболее оптимальных для тестирования иммуномодулирующих свойств веществ различного происхождения наряду с клетками периферической крови [2, 5, 6, 9, 10, 14].

2. Для *in vitro* исследований иммуномодулирующего влияния ЛС на антиген-представляющие клетки показана возможность использования интерферон-альфа-индуцированных ДК. Для ускоренного получения зрелых ДК оптимизирован метод культивирования с использованием ГМ-КСФ и ИНФ- α [3].

3. Разработан комплексный метод, рекомендуемый для скрининга иммунобиологической активности ЛС. Метод включает культивирование исследуемых ЛС с ДК, нейтрофилами, клетками линий Daudi и Jurkat-tat с последующей оценкой экспрессии ряда наиболее информативных поверхностных и внутриклеточных молекул, оценкой фагоцитарной активности и продукции АФК.

Установлено, что наиболее информативными показателями оценки иммуномодулирующего действия ЛС являются: изменение количества клеток, экспрессирующих молекулы CD32, CD80, или уровня продукции ИЛ-12 на 15 % и более, усиление экспрессии молекул HLA-DR на 40 % и более, CD205 на 10 % и более в сравнении с контролем ДК; увеличение интенсивности экспрессии молекул CD80 и HLA-DR клетками линии Daudi на 30 % и более в сравнении с контролем, изменение количества клеток, экспрессирующих CD69 (>20 %) и уровня продукции ФНО- α не менее чем на 10 % в сравнении с контрольными клетками Jurkat-tat.

Для исследования влияния веществ, потенциально обладающих иммуномодулирующим действием на функцию нейтрофилов, наиболее информативными функциональными тестами являются: усиление интенсивности фагоцитоза ФИТЦ-меченых бактерий нейтрофилами на 20 % и более и повышение уровня продукции АФК более чем на 80 % в сравнении с контролем [3, 7, 11, 15].

4. Установлено, что группа иммуномодуляторов микробного происхождения обладает выраженным стимулирующим действием на АПК, нейтрофилы, В-клетки и, в меньшей степени, на Т-клетки.

Иммуномодуляторы синтетического (инозин пранобекс, умифеновир, азоксимера бромида, α -глутамил-триптофана) и тимического (α -глутамил-триптофана, экстракт тимуса КРС) происхождения не оказывают влияния на функциональную активность Jurkat-tat. ЛС на основе умифеновира, азоксимера бромида и высокомолекулярного соединения на основе полифенола, также не оказывают влияния на функциональную активность ДК и В-клеток линии Daudi, за исключением инозина пранобекса, который стимулирует слабую активацию ДК, что выразилось в усилении экспрессии молекул CD205, HLA-DR и в достоверном усилении продукции ИЛ-12 ($p < 0,05$).

ЛС на основе бактерий и инозин пранобекс, как в низкой ($p = 0,03$), так и в высокой ($p = 0,009$) концентрациях, усиливали экспрессию молекулы

HLA-DR клетками линии Daudi. В то же время ЛС растительного (сок травы эхинацеи) и тимического происхождения не оказали влияния на иммунофенотип и функциональную активность исследуемых клеток периферической крови и перевиваемых линий [1, 3, 11].

5. Водные экстракты плодовых тел исследованных грибов *Boletus edulis*, *Ganoderma lucidum* и *Lentinula edodes* повышали продукцию АФК нейтрофилами, моноцитами и ДК, что выразилось в достоверном увеличении продукции АФК по сравнению с контролем ($p < 0,05$). Экстракты грибов рода *Ganoderma*, *Lentinula*, *Boletus* вызывали достоверное увеличение количества ДК, экспрессирующих CD205 ($p < 0,05$), увеличение количества клеток Jurkat-tat, экспрессирующих CD69 и CD86⁺ клеток линии Daudi, увеличение количества базофилов, экспрессирующих молекулы дегрануляции CD63 и CD107a и молекулу активации CD203c, что подтверждает иммунобиологическую активность исследованных экстрактов базидиомицетов и обосновывает возможность использования экстрактов *B. edulis* и биологически активных соединений, извлеченных из него, в качестве нового природного иммуномодулятора [4, 8, 12, 13].

Рекомендации по практическому использованию результатов

1. Созданная коллекция клеточных линий, насчитывающая 19 клеточных культур (Т-клеточные, В-клеточные линии, миелоидные линии), может быть использована для научно-практических исследований в области иммунологии, иммунофармакологии, онкологии и вирусологии (приказ РНПЦ эпидемиологии и микробиологии от 22 апреля 2015 г. № 26 «О создании коллекции культур клеток человека и животных»). База данных, содержащая информацию о линиях клеток, включенных в коллекцию (происхождение, условия роста, иммунофенотип, морфология, кариотип), рекомендуется к использованию при разработке дизайна исследований, в которых применяются данные линии клеток (Регистрационное свидетельство № 1761610437 от 23.11.2016 г.).

2. Зарегистрированные культуры клеток человека – культура моноцитарных интерферон-альфа-индуцированных ДК (№ ИМ-7.104204), МТ-2 (№ ИМ-7.104206), Daudi (№ ИМ-7.104207), Jurkat-tat (№ ИМ-7.104205) (регистрационные удостоверения) – рекомендуется использовать для тестирования иммуномодулирующих ЛС в условиях *in vitro*.

3. Разработанный оригинальный метод оценки биологической активности иммуномодулирующих ЛС с использованием перевиваемых культур клеток человека рекомендуется к использованию при разработке новых ЛС. Получен патент на изобретение (Способ выявления *in vitro* иммунобиологической активности лекарственного средства, № 22781). Результаты внедрены в Институте биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси (акт внедрения от 24.12.2018) и в РНПЦ эпидемиологии и микробиологии (акт внедрения от 20.02.2019).

СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ СОИСКАТЕЛЯ УЧЕНОЙ СТЕПЕНИ

Статьи, опубликованные в научных изданиях, включенных в перечень ВАК Республики Беларусь

1. Дуж, Е. В. Моноцитарные дендритные клетки как *in vitro* модель для тестирования иммуномодуляторов / Е. В. Дуж, А. Е. Гончаров // Новости мед.-биол. наук. – 2016. – Т. 13, № 2. – С 108–116.
2. Дуж, Е. В. Сравнительный профиль экспрессии поверхностных и внутриклеточных молекул Т-лимфоцитарных клеточных линий человека / Е. В. Дуж, А. Е. Гончаров // Новости мед.-биол. наук. – 2018. – № 1. – С. 126–134.
3. Дуж, Е. В. Оценка *in vitro* иммуномодулирующих свойств биологически активных веществ и лекарственных средств / Е. В. Дуж, А. Е. Гончаров // Вест. Нац. акад. наук Беларуси. Сер. мед. наук. – 2019. – Т. 16, № 2. – С. 234–243.
4. Дуж, Е. В. Функциональные свойства иммунных клеток под действием экстрактов грибов *Ganoderma lucidum*, *Lentinula edodes*, *Boletus edulis* / Е. В. Дуж, А. Е. Гончаров // Журн. Белорус. гос. ун-та. Биология. – 2020. – № 3. – С. 29–36.

Статьи в сборниках научных трудов

5. Коллекция культур клеток человека и животных РНПЦ эпидемиологии и микробиологии: нынешнее состояние и перспективы развития [Электронный ресурс] / С. В. Корень, Ю. А. Кабанова, Н. Г. Антоневич, Е. В. Дуж, А. Е. Гончаров, В. А. Горбунов, В. П. Шиманович // Современные проблемы инфекционной патологии человека : сб. науч. ст. / Респ. науч.-практ. центр эпидемиологии и микробиологии. – Минск, 2015. – Вып. 8. – 1 электрон. опт. диск (CD-ROM).
6. Дуж, Е. В. Профиль экспрессии поверхностных маркеров линий клеток миелоидного происхождения [Электронный ресурс] / Е. В. Дуж, А. Е. Гончаров // Современные проблемы инфекционной патологии человека : сб. науч. ст. / Респ. науч.-практ. центр эпидемиологии и микробиологии. – Минск, 2015. – Вып. 8. – 1 электрон. опт. диск (CD-ROM).
7. Дуж, Е. В. Комплексный метод оценки *in vitro* биологической активности иммуностимулирующих веществ [Электронный ресурс] / Е. В. Дуж, А. Е. Гончаров // Достижения медицинской науки Беларуси. – Режим доступа: http://med.by/dmn/book.php?book=16-19_1. – Дата доступа: 12.05.2021.
8. Дуж, Е. В. Влияние грибов рода *Ganoderma*, *Lentinula*, *BOLETUS* на функциональные свойства клеток системы иммунитета [Электронный ресурс] / Е. В. Дуж, А. Е. Гончаров // Современные проблемы инфекционной патологии человека : сб. науч. тр. / Респ. науч.-практ. центр эпидемиологии и микробиологии. – Минск, 2018. – Вып. 11. – 1 электрон. опт. диск (CD-ROM).

9. Дуж, Е. В. Расширенная иммунофенотипическая характеристика В-лимфоцитарных клеточных линий человека [Электронный ресурс] / Е. В. Дуж, А. Е. Гончаров // Современные проблемы инфекционной патологии человека : сб. науч. ст. / Респ. науч.-практ. центр эпидемиологии и микробиологии. – Минск, 2018. – Вып. 11. – 1 электрон. опт. диск (CD-ROM).

Тезисы докладов

10. Hancharou, A. Comparative profile of surface and intracellular molecule expression in 10 immortalized human T cell lines to be considered for immunomodulatory drug evaluations [Electronic resource] / A. Hancharou, A. Duzh, L. M. DuBuske // European Academy of Allergy and Clinical Immunology Congress 2016, Vienna, Austria, 11-15 June 2016 : abstr. [Publ. in] Allergy. – 2016. – Vol. 71, suppl. 102. – P. 434, # 1310. – Mode of access: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.1111/all.12978>. – Date of access: 22.10.2017.

11. Duzh, A. A combined method for screening novel compounds for immunomodulatory activity / A. Duzh, A. Hancharou, L. DuBuske, // Annual Scientific Meeting of the American of Allergy, Asthma and Immunology 2016, San Francisco, California, 10-14 November 2016 : abstr. [Publ. in] Ann. Allergy Asthma a. Immunol. – 2016. – Vol. 117, № 5 (suppl. 1). – P. S85–86, # P320. – Mode of access: [https://www.annallergy.org/article/S1081-1206\(16\)30961-9/pdf](https://www.annallergy.org/article/S1081-1206(16)30961-9/pdf). – Date of access: 10.03.2017.

12. Duzh, A. The influence of the East Asian mushrooms ganoderma lucidum and lentinula edodes and the Belarusian mushroom boietus edulis on immune cell function [Electronic resource] / A. Duzh, A. Hancharou, L. Du Buske // European Academy of Allergy and Clinical Immunology Congress 2017, Helsinki, Finland, 17–21 June 2017 : abstr. [Publ. in] Allergy. – 2017. – Vol. 72, suppl. 103. – P. 753, # 1401. – Mode of access: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.1111/all.13252>. – Date of access: 22.10.2017.)

13. Duzh, A. Effects of 3 different mushrooms, Ganoderma Lucidum, Lentinula Edodes and Boletus Edulis on T cell and Dendritic Cell function [Electronic resource] / A. Duzh, A. Hancharou, L. DuBuske // European Academy of Allergy and Clinical Immunology Congress 2018, Munich, Germany, 26-30 May 2018 : abstr. [Publ. in] Allergy. – 2018. – Vol. 73, suppl. 105. – P. 469, # 0863. – Mode of access: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1111/all.13539>. – Date of access: 14.08.2018.

14. Duzh, A. Immunophenotypic characteristics of human B-lymphocytic cell lines [Electronic resource] / A. Duzh, A. Hancharou // 6th Ukrainian congress for cell biology with international representation, Yaremche, 18–21 June 2019 : proceedings / Ukr. Soc. of Cell Biology, Inst. of Cell Biology NAS of Ukraine, Ivano-Frankivsk Nat. Med. Univ. ; ed.: A. A. Sibirny, R. R. Panchuk, M. Semkiv. – Yaremche, 2019. –

Mode of access: <https://www.cellbiol.lviv.ua/downloads/USCB/2019/USCB-2019-ABook.pdf>. – Date of access: 12.05.2021.

Патент на изобретение

15. Способ выявления *in vitro* иммунобиологической активности лекарственного средства : пат. ВУ 22781, МПК G01N 33/483, G01N 33/50 / А. Е. Гончаров, Е. В. Дуж ; заявитель ГУ «Республиканский научно-практический центр эпидемиологии и микробиологии». – № а 20160304; заявл. 2016.08.12; опубл. 2019.12.30 Афіційны бюл. / Нац. цэнтр інтэлектуал. уласнасці. – 2019. – № 6. – С. 105–106.

РЭЗІЮМЭ

Дуж Алена Васільеўна
Комплексная ацэнка *in vitro* біялагічнай актыўнасці
імунамадулюючых рэчываў

Ключавыя словы: лімфоідныя і міелоідныя клеткавыя лініі, імунамадулятары, праточная цытаметрыя.

Мэта даследавання: навукова абгрунтаваць выкарыстанне клеткавых ліній для ацэнкі імунабіялагічных уласцівасцяў лекавых сродкаў на аснове вывучэння імунафенатыпічных характарыстык перавівальных лімфоідных і міелоідных ліній клетак.

Аб'ект даследавання: лімфоідныя і міелоідныя клеткавыя лініі, перыферычная кроў чалавека.

Метады даследавання: імуналагічныя, культуральныя, статыстычныя.

Атрыманыя вынікі і іх навізна. Упершыню дэтальна ахарактарызаваны антыгенны профіль 19 перавівальных клеткавых ліній: C-8166, SEM-SS, SEM-NK^R, Molt-3, Molt-4, Molt-4 клон 8, Jurkat, Jurkat-tat, MT-2, MT-4, Daudi, IM-9, Raji, RPMI-1788, U-937, THP-1, KG-1, HL-60 і CCRF-SB.

Распрацаваны комплексны метады ацэнкі імунамадулюючых уласцівасцей лекавых сродкаў з выкарыстаннем перавівальных культур клетак чалавека і клетак перыферычнай крыві здаровых асоб.

Устаноўлена, што група лекавых сродкаў мікробнага паходжання валодае найбольш высокай імунабіялагічнай актыўнасцю на антыгенпрадстаўляльныя клеткі, нейтрафілы, В-клеткі ліній Daudi і, у меншай ступені, на Т-клеткі Jurkat-tat. Група лекавых сродкаў сінтэтычнага паходжання аказала актыўуючае дзеянне на дэндрытныя клеткі і В-клеткі ліній Daudi. Лекавыя сродкі сінтэтычнага, расліннага і тымічнага паходжання не ўплывалі на функцыянальную актыўнасць клетак натуральнага імунітэту, у тым ліку перавівальных клеткавых ліній.

Выяўлена імунамадулюючае дзеянне воднага экстракту грыба *Boletus edulis* на ўсе клеткі імуннай сістэмы, што прадугледжвае магчымасць яго выкарыстання ў якасці імунамадулятара.

Рэкамендацыі па выкарыстанні: распрацаваны арыгінальны метады ацэнкі біялагічнай актыўнасці імунамадулюючых лекавых сродкаў з выкарыстаннем лімфоідных і міелоідных перавівальных культур клетак чалавека рэкамендуецца да выкарыстання пры распрацоўцы новых лекавых сродкаў.

Галіна прымянення: імунафармакалогія, імуналогія, клеткавая біялогія.

РЕЗЮМЕ

Дуж Елена Васильевна

Комплексная оценка *in vitro* биологической активности иммуномодулирующих веществ

Ключевые слова: лимфоидные и миелоидные клеточные линии, иммуномодуляторы, проточная цитометрия.

Цель работы: научно обосновать использование клеточных линий для оценки иммунобиологических свойств лекарственных средств на основе изучения иммунофенотипических характеристик перевиваемых лимфоидных и миелоидных линий клеток.

Объект исследования: лимфоидные и миелоидные клеточные линии, периферическая кровь человека.

Методы исследования: иммунологические, культуральные, статистические.

Полученные результаты и их новизна. Впервые детально охарактеризован антигенный профиль 19 перевиваемых линий клеток: С-8166, СЕМ-SS, СЕМ-NK^R, Molt-3, Molt-4, Molt-4 клон 8, Jurkat, Jurkat-tat, МТ-2, МТ-4, Daudi, IM-9, Raji, RPMI-1788, U-937, ТНР-1, KG-1, HL-60 и ССRF-SB.

Разработан комплексный метод оценки иммуномодулирующих свойств лекарственных средств с использованием перевиваемых культур клеток человека и клеток периферической крови здоровых лиц.

Установлено, что группа лекарственных средств микробного происхождения обладает наиболее высокой иммунобиологической активностью на антиген-представляющие клетки, нейтрофилы, В-клетки линии Daudi и, в меньшей степени, на Т-клетки Jurkat-tat. Группа лекарственных средств синтетического происхождения оказала активирующее действие на дендритные клетки и В-клетки линии Daudi. Лекарственные средства синтетического, растительного и тимического происхождения не влияли на функциональную активность клеток естественного иммунитета, в том числе перевиваемых клеточных линий.

Выявлено иммуномодулирующее действие водного экстракта гриба *Boletus edulis* на все клетки иммунной системы, что предполагает возможность его использования в качестве иммуномодулятора.

Рекомендации по использованию: разработанный оригинальный метод оценки биологической активности иммуномодулирующих лекарственных средств с использованием лимфоидных и миелоидных перевиваемых культур клеток человека рекомендуется к использованию при разработке новых лекарственных средств.

Область применения: иммунофармакология, иммунология, клеточная биология.

SUMMARY

Duzh Elena Vasilievna

Integrated evaluation of immunomodulatory drug biological activity *in vitro*

Key words: lymphoid and myeloid cell lines, immunomodulators, flow cytometry.

The aim of the study: Scientific substantiate of cell line use for the evaluation of the drug immunobiological activity through the study of the immunophenotypical properties of transplantable lymphoid and myeloid cells lines.

The object of research: lymphoid and myeloid cell lines, human peripheral blood.

Methods of research: immunology methods, cell culture-based methods, statistical analysis.

Results obtained and their novelty. For the first time, the antigen profile of 19 transplantable cell lines C-8166, CEM-SS, CEM-NKR, Molt-3, Molt-4, Molt-4 clone 8, Jurkat, Jurkat-tat, MT-2, MT-4, Daudi, IM-9, Raji, RPMI-1788, U-937, THP-1, KG-1, HL-60 and CCRF-SB was comprehensively characterized.

The integrated method of the evaluation of drug immunomodulatory properties with the use of transplantable human cell cultures and peripheral blood cells of healthy individuals was developed.

It was established that a group of microbial drugs carries the most pronounced immunobiological activity towards antigen-presenting cells, neutrophils, B-cells of the Daudi line and to a lesser extent towards Jurkat-tat T-cells. A group of drugs of synthetic origin had an activating effect on dendritic cells and B-cells of the Daudi line.

The medications of synthetic, plant and thymic origin didn't have any impact on functional activity of innate immune system as well as on transplantable lymphoid and myeloid cell lines

The immunomodulatory effect of the *Boletus edulis* water extract on all immune cells was established, suggesting the possibility of its usage as an immunomodulator.

Recommendations for practical use: the developed original method of biological activity evaluation of immunomodulatory medicines with the use of lymphoid and myeloid transplantable human cell lines is recommended for use when developing new pharmaceuticals.

Application area: immunopharmacology, immunology, cell biology.

Подписано в печать 06.02.23. Формат 60×84/16. Бумага писчая «Хероx office».
Ризография. Гарнитура «Times».
Усл. печ. л. 1,39. Уч.-изд. л. 1,38. Тираж 60 экз. Заказ 77.

Издатель и полиграфическое исполнение: учреждение образования
«Белорусский государственный медицинский университет».
Свидетельство о государственной регистрации издателя, изготовителя,
распространителя печатных изданий № 1/187 от 18.02.2014.
Ул. Ленинградская, 6, 220006, Минск.