

Державна установа «Інститут мікробіології та імунології
імені І.І. Мечникова Національної академії медичних наук України»
Київський національний університет імені Тараса Шевченка
Міністерство освіти і науки України

Кваліфікаційна наукова
праця на правах рукопису

ПОГОРІЛА МАРИНА СЕРГІЇВНА

УДК: 612.017.11:612.014.482.4

ДИСЕРТАЦІЯ

**ІМУНОМОДУЛЯТОРНІ ВЛАСТИВОСТІ ЕКСТРАКТУ З ЕМБРІОНАЛЬНИХ
ТКАНИН ПТАХІВ 9-ТИ ДІБ РОЗВИТКУ ЗА ІНДУКОВАНОЇ ІМУНОДЕПРЕСІЇ**

03.00.09 – імунологія

Подається на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук

Дисертація містить результати власних досліджень. Використання ідей,
результатів і текстів інших авторів мають посилання на відповідне джерело

_____ М.С. Погоріла

Науковий керівник Романова Олена Анатоліївна, кандидат біологічних наук

Київ – 2018

АНОТАЦІЯ

Погоріла М.С. Імуномодуляторні властивості екстракту з ембріональних тканин птахів 9-ти діб розвитку за індукованої імунодепресії. – Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.09 – імунологія. – Державна установа «Інститут мікробіології та імунології імені І. І. Мечникова Національної академії медичних наук України»; Київський національний університет імені Тараса Шевченка МОН України, Київ, 2018.

Дисертація присвячена дослідженню ефектів екстракту з ембріональних тканин птахів 9-ти діб розвитку на процеси гемо-, імунопоезу та імуногенезу за індукованої імунодепресії.

На першому етапі роботи було досліджено концентрацію білка в екстракті з ембріональних тканин птахів 9-ти діб розвитку (ЕЕТП 9) та рівень основного фактору росту фібробластів (FGFb) в ньому. Означені характеристики слугували критеріями стандартизації ЕЕТП 9. Перевірено якість зразків ЕЕТП 9 за критеріями присутності бактеріальних токсинів, стерильності. Досліджено анафілактогенні властивості ЕЕТП 9. Так, було показано, що ЕЕТП 9 містить $0,77 \pm 0,05$ мг/мл білка та $120 \pm 6,8$ нг/мл FGFb, на рівень яких достовірно не впливає зберігання в рідкому азоті. Гель-тромб методом (граничне випробування) встановлено відсутність бактеріального ендотоксину та шляхом прямого висівання на рідке тіогліколеве й соєво-казеїнове живильні середовища – стерильність. В експериментах на мурчаках було показано відсутність анафілагенних властивостей ЕЕТП 9.

Імуномодуляторні властивості ЕЕТП 9 та його окремих фракцій були оцінені в тестах *in vitro* за здатністю до впливу на функціональний стан спленоцитів та перитонеальних макрофагів, вилучених від мишей із циклофосфамідною імунодепресією. Було констатовано переважання саме цільного ЕЕТП 9, що справляв більш високий стимуляторний вплив *in vitro*,

підвищуючи у 2,3 раза рівень ІЛ-2 синтезованого спленоцитами порівняно з контролем, в 1,7 раза – фагоцитарну активність перитонеальних макрофагів.

Імуномодуляторні властивості ЕЕТП 9 досліджувалися в серії експериментів *in vivo* на мишах за радіаційно-індукованої імунодепресії. В серії паралельних експериментів на мишах, що були піддані впливу γ -випромінювання в діапазоні доз 3 – 9 Гр було показано, що одноразове застосування ЕЕТП 9 мишам в дозі 0,1 мг/кг за добу перед дією γ -випромінювання зрушує $LD_{50/30}$ з 6 Гр до 7 Гр. Таким чином, фактор зміни дози для ЕЕТП 9 за одноразового застосування складає 1,16. Введення ЕЕТП 9 забезпечувало 38,1 % виживаність мишей протягом 30-ти діб після дії летального γ -випромінювання в дозі 9 Гр, (LD_{80-100}).

Подальші експерименти проводилися за умови п'ятиразового внутрішньом'язового введення ЕЕТП 9 мишам із радіаційною імунодепресією викликаною дією гострого тотального γ -випромінювання в дозі 5 Гр.

В ході даного етапу було оцінено морфологічний стан кісткового мозку (КМ), тимусу та селезінки. Встановлено, що ЕЕТП 9 сприяє відновленню морфологічного складу кісткового мозку, тимусу, селезінки, яке характеризується активізацією процесів морфогенезу тканин органів, проліферації та диференціювання їх клітинних елементів порівняно зі спонтанною реконституцією. Структура кістковомозкової тканини набуває фізіологічного стану під впливом ЕЕТП 9 на 14-ту добу дослідження, тоді як реставраційні процеси у тимусі та селезінці на цей термін ще тривають.

В ході виконання подальших етапів роботи в умовах експериментальної індукованої радіаційної імунодепресії імуномодуляторні ефекти ЕЕТП 9 порівнювалися із ефектами офіціального препарату «Ербісол».

За оцінки динаміки відновлення клітинності уражених радіаційною імунодепресією органів гемопоєзу та імунної системи було встановлено, що повне відновлення абсолютного числа каріоцитів КМ та фенотипового складу його лімфоїдного компартменту під дією ЕЕТП 9 відбувається на 14-ту добу, тимоцитів

та каріоцитів селезінки – на 21-шу, випереджаючи їх реставрацію під впливом препарату порівняння «Ербісол» на 7 діб

Детальна увага була приділена кількісним та функціональним показникам стану кісткового мозку, а саме оцінено вплив ЕЕТП 9 на динаміку встановлення фізіологічних пропорцій клітин його лімфоїдного компартменту, а також рівень продуктів перекисного окиснення ліпідів мієлокаріоцитів. Досліджено вплив ЕЕТП 9 на вміст гемопоетичних цитокінів, що продукувалися мієлокаріоцитами культивованими *in vitro* отриманими від мишей із радіаційною імунодепресією. Показано, що під дією ЕЕТП 9 відносне число sm^+ та більш зрілих sm^+sm^- -клітин досягало норми на 14-ту добу після індукції імунодепресії, коли за дії препарату порівняння ці показники були зниженими в 1,7 та 1,8 раза відповідно, а досягали норми на 21-шу добу. Фізіологічний рівень відносного числа $CD90.2^+$ в КМ під впливом екстракту та препарату порівняння встановлювався синхронно, а саме на 7-му добу. Вміст первинних та вторинних продуктів перекисного окиснення ліпідів (ПОЛ) каріоцитів кісткового мозку за впливу ЕЕТП 9 досягав значень у інтактних тварин на 14-ту добу, поряд з його перевищенням на 30 % на цей термін у групи, що отримувала «Ербісол». ЕЕТП 9 модулює продукцію гемопоетичних цитокінів протягом 1-ої доби після індукції імунодепресії, підвищуючи вміст G-CSF у 257,0 – 506,0 разів, IL-6 – у 1,5 – 25,0 разів та знижуючи вміст Flt3-ligand у 1,1 – 1,6 разів порівняно з контролем, переважаючи ефекти від застосування «Ербісол», а саме: підвищення вмісту G-CSF у 1,2 – 1,5 раза, IL-6 – у 1,9 – 4,3 раза, зниження вмісту Flt3-ligand у 1,2 – 1,4 раза порівняно з контролем. Нормалізація вмісту IL-6 та Flt3-ligand за впливу ЕЕТП 9 настає на 3-тню добу, G-CSF – на 7-му добу, випереджаючи реконституцію фізіологічних рівнів означених цитокінів за використання «Ербісол».

Динаміка пострадіаційного відновлення кількісних та функціональних показників клітин периферичної крові також вивчалася під впливом ЕЕТП 9. Так, було досліджено дію ЕЕТП 9 щодо характеру відновлення абсолютного числа лейкоцитів і окремо популяцій лімфоцитів периферичної крові, оцінено проліферативну здатність Т-лімфоцитів та функціональну спроможність

нейтрофілів, вміст цитокінів у сироватці крові, і на довершення, здатність до поствакцинальної специфічної антитілопродукції в умовах радіаційної імунодепресії. Результатом застосування ЕЕТП 9 було відновлення абсолютного числа лейкоцитів, лімфоцитів та гранулоцитів крові на 14-ту добу, що випереджало реконституцію цих показників у групі порівняння на 27 %, 57 % та 26 % відповідно, ($p \leq 0,05$). Нормалізація частки $CD3^+$, $CD4^+$, $CD8^+$ лімфоцитів у групах із застосуванням ЕЕТП 9 та «Ербісол» відбувалася одночасно (на 7-му добу), частки $CD45R/B220$ -лімфоцитів – на 14-ту добу з випередженням на 30 % у групі, що отримувала за імунодепресії «Ербісол», ($p \leq 0,05$). Застосування ЕЕТП 9 сприяло відновленню мітоген-активованої проліферативної активності Т-лімфоцитів на 21-шу добу після індукції імунодепресії, з перевершенням на цей строк у 1,5 раза відповідного показника у групі порівняння. У разі застосування обох засобів фагоцитарний індекс досяг фізіологічного рівня у тварин із імунодепресією на 14-ту добу, фагоцитарне число нейтрофілів – на 21-шу добу, одночасно в обох групах, в той час, коли у групі тварин зі спонтанним відновленням ці показники були в 1,6 та 1,2 раза нижчими за показники в групі інтактних тварин. Застосування ЕЕТП 9 стимулювало продукцію ІЛ-1 β , ІЛ-6 та ІЛ-4 у мишей впродовж 1-ої доби після індукції імунодепресії, достовірно підвищуючи їх вміст в сироватці крові порівняно з контролем у 127,0 – 341,0 разів; 2,0 – 350,0 та 3,0 – 60,0 разів відповідно, переважаючи цим ефекти від «Ербісол»: зростання ІЛ-1 β у 45,0 – 174,0 разів; ІЛ-6 – у 3,0 – 47,0 разів; ІЛ-4 – у 1,5 – 33,0 рази. Під впливом ЕЕТП 9 нормалізація вмісту ІЛ-1 β , ІЛ-6 та ІЛ-4 настає на 7-му добу дослідження, тоді як за дії препарату «Ербісол» надмірність продукції всіх означених цитокінів спостерігається до закінчення періоду дослідження – 31-ої доби. Середньгеометричний титр специфічних протигрипозних антитіл за імунізації “Inflexal V” у групі із імунодепресією, що отримувала ЕЕТП 9, перевищував їх титр у тварин, яким застосовували «Ербісол» в 1,3 та 1,8 раза на 14-ту та 30-ту добу після імунізації відповідно.

Ключові слова: екстракт з ембріональних тканин птахів 9-ти діб розвитку, індукована імунодепресія, імуномодуляція, функціональний стан імунної системи.

SUMMARY

Pohorila MS. Immunomodulating properties of extract from embryonic tissues of birds of 9 days of fetation with induced immunodepression. - Qualifying scientific work on the rights of manuscripts.

Dissertation for the Candidate of biological sciences in specialty 03.00.09 – immunology. – State organisation «Mechnikov Institute of Microbiology and Immunology of National Academy of Medical Sciences of Ukraine»; Taras Shevchenko National University of Kyiv, Ministry of Education and Science of Ukraine, Kyiv, 2018.

The dissertation is devoted to the study of immunomodulatory properties of extract from embryonic tissues of birds of 9 days of fetation (ETE 9) on hemo-, immunopoiesis and immunogenesis on the radiation-induced model.

The protein concentration and level of basic fibroblast growth factor (FGFb) in extract from embryonic tissues of birds of 9 days of fetation (ETE 9) were studied at the first step of our work. These characteristics served as the criteria for standardization of ETE 9. Also the presence of bacterial toxins and sterility of ETE 9 samples were tested, what were the criteria of ETE 9 quality. In epy series of experiments, the anaphylactogenicity of ETE 9 has been investigated on guinea pigs.

It was demonstrated that ETE 9 contains (0.77 ± 0.05) mg/ml of protein and $(120,0 \pm 6,80)$ ng/ml of FGFb, which levels were not significantly affected by storage in liquid nitrogen. The absence of a bacterial endotoxin by using gel-thrombus method (limit test) and sterility by direct sowing to a liquid thioglycollate digest and a soybean-casein digest were shown. In the experiments on Guinea pigs the absence of anaphylaxis-provoking properties of ETE 9 was also demonstrated.

Immunomodulatory properties of the ETE 9 and its hydrophilic and hydrophobic fractions in relation to the functional activity of splenocytes and peritoneal macrophages obtained from irradiated mice have been evaluated using *in vitro* tests. The predominance of the whole ETE 9 was shown, when the ensuring a higher stimulatory effect *in vitro* than individual hydrophilic or hydrophobic fractions was shown under the

whole ETE 9 – increasing in 2.3 times the level of IL-2 in comparison with control, and in 1.7 times – phagocytic index of peritoneal macrophages.

Immunomodulatory properties of ETE 9 were also studied in the series of experiments *in vivo* in mice on a radiation-induced immunosuppression model. In a series of parallel experiments on mice exposed to γ -radiation in the dose range of 3 to 9 Gy was shown, that a single application of ETE 9 to mice in a dose of 0.1 mg/kg prior to the action of gamma radiation shifts LD_{50/30} from 6 Gy to 7 Gy. Thus, the dose change factor for ETE 9 for its single use is 1.16. The ETE 9 administration provided 38.1 % survival of mice within 30 days after exposing to lethal γ -radiation at a dose of 9 Gy (LD₈₀₋₁₀₀).

Subsequent experiments were conducted in condition of 5-times administration of ETE 9 to mice with radiation-induced immune depression, which was induced by single-dose total γ -radiation in a dose of 5 Gy. After the ETE 9 supplementation to mice with radiation immunodepression the morphological state of hemopoiesis' organs, as well as the dynamics of their cellularity were assessed. It was shown, that the usage of ETE 9 contributes to the restoration of the morphological composition of bone marrow, thymus, spleen, which was characterized by activation of organ-tissue morphogenesis, proliferation and the differentiation of their cellular elements in comparison with their spontaneous reconstitution. The structure of bone marrow tissue acquires a physiological state under the influence of ETE 9 on the 14th day of the study, while the restoration processes in the thymus and spleen for this term were still ongoing.

The complete restoration of the absolute number of BM cells and the phenotypic composition of its lymphoid compartment under the action of ETE 9 occurs on the 14th day, thymocytes and cariocytes of spleen – by 21th, ahead of their restoration ($p \leq 0.05$) under the influence of the comparator «Erbisol», which occurs by 7 days later.

More attention was paid to the quantitative and functional parameters of the bone marrow state, in particular, the effect of ETE 9 on the dynamics of the lymphoid cells proportions normalization, as well as the level of lipid peroxidation in this organ, were estimated. The influence of ETE 9 on level of important hematopoietic cytokines

produced by *in vitro* cultured myelocaryocytes collected from mice with radiation immunodepression was studied.

The level of primary and secondary products of lipid peroxidation of bone marrow cariocytes under the influence of ETE 9 normalized by the 14th day, along with its excess of 30 % for this period in the group receiving «Erbisol». The ETE 9 modulates the production of hematopoietic cytokines within 1st day after induction of immunosuppression, increasing G-CSF levels by 257.0 – 506.0, IL-6 – by 1.5 – 25.0 times, and decreasing the level of Flt3-ligand by 1.1 – 1.6 times comparing with control, with the predominance of effects from the use of «Erbisol», namely: an increase in the concentration of G-CSF in 1.2 – 1.5 times, IL-6 – in 1.9 – 4.3 times, decrease of Flt3-ligand level in 1.2 – 1.4 times in comparison with control. The normalization of the content of IL-6 and Flt3-ligand after ETE 9 administration occurs on the 3d day, G-CSF – on the 7th day, ahead of the reconstitution of the physiological levels of the indicated cytokines with the use of «Erbisol».

The dynamics of post-radiation restoration of quantitative and functional measures of the peripheral blood's immune competent cells was also studied under the influence of ETE 9. Thus, the effect of ETE 9 on the character of blood cells relative number normalization and, in particular, lymphocyte populations recovery, the proliferative capacity of T-lymphocytes and functional capacity of neutrophils, the immune regulatory cytokines serum levels, and on top of that, the ability of post vaccination specific antibody production in conditions of radiation-associated immunosuppression were also studied.

The result of the application of ETE 9 was the restoration of the absolute number of leukocytes, lymphocytes and granulocytes of peripheral blood on the 14th day, ahead of the reconstitution ($p \leq 0.05$) of the corresponding indices in the comparison group by 27 %, 57 % and 26 %, respectively. The normalization of the CD3⁺, CD4⁺, CD8⁺-lymphocyte in the groups using ETE 9 and «Erbisol» occurred simultaneously (in the 7th day), the subpopulation of CD45R/B220-lymphocytes – on the 14th day, with an advance of 30 % in the group received immunosuppressive "Erbisol", ($p \leq 0,05$). The use of ETE 9 contributed to the restoration of mitogen-activated proliferative activity of

T-lymphocytes on 21st day after the induction of immunosuppression, with a surplus of 1.5 times that of the corresponding indicator in the comparison group. The phagocytic index and the phagocytic number of neutrophils reached the physiological level in animals with immunosuppression after using of ETE 9 and «Erbisol» on the 14th day and 21st day respectively, both in two groups, while in the group of animals with spontaneous regeneration these rates were by 1.6 and 1.2 times lower than normal.

The use of ETE 9 stimulates the production of IL-1 β , IL-6 and IL-4 in mice during the first day after induction of radiation immunodepression, by 350.0 times and by 3.0 – 60.0 times, respectively, exceeding the effects of the use of «Erbisol»: IL-1 β increasing was in 45.0 – 174.0 times, IL-6 – in 3.0 – 47.0 times, IL-4 – in 1.5 – 33.0 times. Under the influence of ETE 9, the normalization of IL-1 β , IL-6 and IL-4 levels occurs on the 7th day of the experiment, while under the influence of «Erbisol», the excess production of all of the indicated cytokines was observed till the end of the experiment – 31st day.

The median geometric titre of specific anti-influenza antibodies after immunization by "Inflexal V" in the immunodepressed group of animals receiving ETE 9 exceeded the titre in animals with «Erbisol» in 1.3 – 1.8 times.

Keywords: embryonic tissues of birds extract of 9 days of fetation, induced immunosuppression, immunomodulation, functional state of the immune system.

Список публікацій здобувача

1. Погорелая МС, Жегунов ГФ, Щербак ОН. Влияние экстракта куриных эмбрионов на состояние нейтрофилов периферической крови мышей после однократного тотального γ -облучения. Вестник Харьковского национального университета имени В.Н. Каразина, серия "Биология. 2012;1035(16):185-91.
2. Погорелая МС, Жегунов ГФ, Щербак ОН. Влияние экстракта куриных эмбрионов на состояние микрофлоры кишечника мышей после однократного тотального γ -облучения. Вестник Харьковского национального университета имени В.Н. Каразина, серия "Биология. 2013;1056(17):185-90.
3. Погорелая МС, Жегунов ГФ, Щербак ОН. Влияние экстракта из куриных эмбрионов на количественные изменения в периферической крови мышей вследствие однократного тотального γ -облучения. Вестник Харьковского национального университета имени В.Н. Каразина, серия "Биология". 2013;1079(18):164-71.
4. Кузнецова ВГ, Погоріла МС, Жегунов ГФ. Дослідження вмісту амінокислот та жирних кислот в екстракті з ембріонів курей. «Вісник проблем біології та медицини». 2014;3(115):60-4.
5. Погоріла МС. Вплив препарату з ембріональних тканин птахів на морфологію тимусу мишей за радіаційної імунодепресії. «Вісник проблем біології та медицини». 2015;1(118):98-102.
6. Pohorila MS, Popov MM, Romanova OA, Sherbak OM, Martinov AV. Dynamics of hematopoiesis regulators content in bone marrow under the poultry embryonic tissue extract usage for the radiation-caused immune damage correction. Вестник Харьковского национального университета имени В.Н. Каразина, Серия "Биология". 2016;27:131-40.
7. Погоріла МС. Вплив препарату з ембріональних тканин птахів на динаміку вмісту цитокінів і С-реактивного білку в сироватці крові мишей після дії γ -випромінювання. Фізіологічний журнал. 2015;61(2):87-93.

8. Погорелая МС, Романова ЕА. Влияние экстракта из эмбриональных тканей птиц на адаптивный иммунитет у мышей при индуцированной иммунодепрессии. Научные ведомости Белгородского государственного университета. Естественные науки. 2015;21(218):65-70.

9. Погорелая МС. Влияние препарата из эмбриональных тканей птиц на морфологию бедренной кости мышей, подвергнутых действию тотального γ -излучения. Научные ведомости Белгородского государственного университета. Естественные науки. 2015;9(206):73-9.

10. Михайличенко МС (Погорелая МС), Мершинець ЮО, Жегунов ГФ. Вплив екстракту ембріонів курей на рівень С-реактивного білка у мишей при умові радіаційного опромінення. Збірник наукових робіт частина I «Матеріали XI наукової конференції студентів та молодих учених». 13-15 квітня 2011 р. Дніпропетровськ. 2011;169.

11. Погоріла МС, Щербак ОМ, Жегунов ГФ. Вплив екстракту курей на рівень фактору некрозу пухлини- α у мишей на фоні радіаційного опромінення. Матеріали Науково-практичної конференції з міжнародною участю «Актуальні питання біології, екології, медицини та фармакології». 26-27 вересня 2013. Дніпропетровськ. 2013;85-6.

12. Погоріла МС, Щербак ОМ, Жегунов ГФ. Лізоцим сироватки крові мишей на фоні іонізуючого випромінювання. Матеріали III Международной научной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых. 24-27 февраля 2014 г., г. Донецк. Фундаментальные и прикладные исследования в биологии. 2014;218.

13. Погорелая МС, Жегунов ГФ, Щербак ОН. Уровень сывороточного ИЛ-4 на фоне профилактического применения экстракта из эмбрионов кур при радиационном воздействии. Матеріали XIII Всероссийской молодежной научной конференции Института физиологии Коми научного центра НЦ УрО РАН «Физиология человека и животных: от эксперимента к клинической практике», 22-24 апреля 2014 г., г. Сыктывкар, Республика Коми, Россия). 2014;115.

14. Погоріла МС, Жегунов ГФ, Щербак ОМ. Рівень ІЛ-6 в сироватці крові мишей на тлі застосування екстракту із курячих ембріонів перед впливом γ -випромінювання. Матеріали міжнародної науково-практичної конференції «Теоретичні та практичні аспекти розвитку сучасної медицини», 27-28 червня 2014 р., м. Львів. 2014;93-5.

15. Погоріла МС, Щербак ОМ, Романова ОА. Вплив сублетального γ -випромінювання на рівень ІЛ-1 β в сироватці крові мишей за умови профілактичного застосування екстракту з курячих ембріонів. Матеріали міжнародної науково-практичної конференції «Медична наука та практика: актуальні питання взаємодії», 5-6 вересня 2014 р., м. Київ. 2014;23-5.

16. Погоріла МС, Романова ОА, Щербак ОМ. Оцінка алергізуючих властивостей препарату з ембріональних тканин птахів. Матеріали міжнародної науково-практичної конференції «Сучасні тенденції у медичних та фармацевтичних науках», 5-6 грудня 2014 р., Київ. 2014;119-20.

17. Погоріла МС, Романова ОА, Сидоренко ТА, Щербак ОМ. Динаміка процесів ПОЛ в кістковому мозку мишей при застосуванні препарату з ембріональних тканин птахів за радіаційно-індукованої імунодепресії. Матеріали міжнародної науково-практичної конференції «Пріоритети сучасної медицини: теорія і практика» 6-7 лютого 2015 р., Одеса. 2015;206-8.

18. Погоріла МС, Романова ОА, Щербак ОМ, Сидоренко ТА. Оцінка радіозахисної ефективності застосування препарату з ембріональних тканин птахів за показниками виживаності. Матеріали науково-практичної конференції з міжнародною участю «Щорічні терапевтичні читання: Від досліджень до реалій клінічної практики XXI століття» присвяченій пам'яті академіка Л.Т. Малої 23-24 квітня 2015 року, м. Харків. 2015;234.

19. Романова ОА, Сидоренко ТА, Ігумнова НІ, Юхименко ВІ, Щербак ОМ. Вплив екстракту з ембріональних тканин птахів на формування адаптивного імунітету у мишей за індукованої імунодепресії. Матеріали науково-практичної конференції за участю міжнародних спеціалістів «Актуальні питання боротьби з

інфекційними захворюваннями», присвячена 170-й річниці з дня народження І.І. Мечникова, 14-15 травня 2015 р., м. Харків. 2015;77.

20. Погоріла МС, Романова ОА, Сидоренко ТА, Ігумнова НІ, Юхименко ВІ, Щербак ОМ. Вміст FGFb в екстракті з ембріональних тканин птахів. Міжнародна науково-практична конференція «Проблеми та стан розвитку медичної науки та практики в Україні», 10-11 червня 2016, м. Дніпро. 2016;96-8.

21. Погоріла МС, Щербак ОМ. Вплив екстракту із ембріональних тканин птахів та його фракцій на рівень продукції ІЛ-2 *in vitro* за імунодепресії в експерименті. Науково-практична конференція молодих вчених, присвячена 25-річчю Національної академії медичних наук України. Журнал Національної академії медичних наук України. Матеріали конференції. Спеціальний випуск, Київ, 23 березня 2018:86.

ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ	20
ВСТУП	22
РОЗДІЛ 1 ПРОБЛЕМА ІНДУКОВАНОЇ ІМУНОДЕПРЕСІЇ ТА ШЛЯХИ ЇЇ ПОДОЛАННЯ	28
1.1 Фактори розвитку імунодепресивних станів	28
1.2 Профілактика та корекція імунологічних порушень при депресії кровотворної та імунної систем. Біопрепарати	36
1.2.1 Імуномодуляторні препарати мікробного походження, що застосовують для профілактики та корекції імунологічних порушень	37
1.2.2 Рекombінантні препарати цитокінів, що застосовують при корекції дефіцитів гемопоезу та імуногенезу	38
1.2.3 Природні препарати тваринного походження, що знайшли застосування у корекції порушень гемопоезу та імуногенезу	40
РОЗДІЛ 2 МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ	52
2.1 Характеристика лабораторних тварин	52
2.2 Схеми експериментів	53
2.2.1 Приготування екстракту, контроль якості та стандартизація	53
2.2.2 Визначення деяких конститuentів ЕЕТП 9 та його фракцій	54
2.2.3 Порівняння імуномодуляторних властивостей цільного ЕЕТП 9 та його фракцій	55
2.2.4 Визначення алергізуючих властивостей ЕЕТП 9	55
2.2.5 Індукція радіаційної імунодепресії в експерименті на мишах та первинна оцінка імуотропних властивостей ЕЕТП 9	57
2.2.5.1 Вплив ЕЕТП 9 на 30-ти добову виживаність мишей за умови променевого ураження в діапазоні доз 3 – 9 Гр	57

2.2.5.2	Вплив ЕЕТП 9 на морфологічну структуру органів імунної системи при опроміненні мишей в дозі 5 Гр	58
2.2.5.3	Оцінка ефектів ЕЕТП 9 та офіційного препарату «Ербісол» щодо стану гемо-, імунопоезу та імуногенезу за радіаційно-індукованої імунодепресії в експерименті	59
2.3	Екстракт з ембріональних тканин птахів 9-ти діб розвитку (ЕЕТП 9) та препарат порівняння	62
2.4	Методи дослідження	63
2.4.1	Контроль якості ЕЕТП 9	63
2.4.2	Визначення концентрації білка в ЕЕТП 9	64
2.4.3	Визначення вмісту FGFb в ЕЕТП 9	65
2.4.4	Фракціонування ЕЕТП 9	65
2.4.5	Дослідження спектру та кількості амінокислот ЕЕТП 9	66
2.4.6	Дослідження спектру та кількості жирних кислот ЕЕТП 9	67
2.4.7	Стандартизація ЕЕТП 9	68
2.4.8	Визначення концентрації ІЛ-2, синтезованого спленоцитами мишей із циклофосфамідною імунодепресією під впливом цільного ЕЕПТ 9 та його фракцій <i>in vitro</i>	69
2.4.9	Визначення рівня показників фагоцитарної активності перитонеальних макрофагів мишей із циклофосфамідною імунодепресією під впливом цільного ЕЕПТ9 та його фракцій <i>in vitro</i>	70
2.4.10	Дослідження алергізуючих властивостей ЕЕТП 9	71
2.4.11	Вплив ЕЕТП 9 на показники виживаності мишей, які були піддані дії γ -випромінювання в діапазоні доз 3 – 9 Гр	72
2.4.11.1	30-ти добова виживаність мишей, що були піддані дії γ -випромінювання в діапазоні доз 3 – 9 Гр з метою визначення фактору зміни дози	73

2.4.11.2	Оцінка ефективності ЕЕТП 9 за середньою тривалістю життя мишей при їх опроміненні в дозі LD ₈₀₋₁₀₀ (9 Гр)	73
2.4.12	Дослідження морфологічної структури органів імунної системи мишей	74
2.4.13	Визначення загального числа лейкоцитів периферичної крові мишей	75
2.4.14	Визначення абсолютного числа формених елементів периферичної крові мишей	75
2.4.15	Виділення мононуклеарів периферичної крові та визначення відносного числа популяцій лімфоцитів мишей	75
2.4.16	Визначення абсолютного числа каріоцитів кісткового мозку мишей	77
2.4.17	Визначення відносного числа sm^+sm^- та sm^+ клітин у лімфоїдному пулі кісткового мозку мишей	77
2.4.18	Визначення відносного числа зрілих Т-лімфоцитів CD90.2 ⁺ (Thy 1.2) мишей	78
2.4.19	Визначення абсолютного числа каріоцитів тимусу мишей	79
2.4.20	Визначення абсолютного числа каріоцитів селезінки мишей	79
2.4.21	Визначення вмісту цитокінів в супернатанті каріоцитів кісткового мозку, культивованих <i>in vitro</i> , у мишей	79
2.4.22	Визначення вмісту цитокінів в сироватці крові мишей	80
2.4.23	Визначення показників фагоцитарної активності нейтрофілів периферичної крові мишей	81
2.4.24	Визначення здатності нейтрофілів периферичної крові до відновлення нитросинього тетразолію (НСТ-тест) у мишей	82
2.4.25	Визначення рівня катіонних білків у нейтрофілах периферичної крові мишей	82

2.4.26	Визначення активності лужної фосфатази в нейтрофілах периферичної крові мишей	83
2.4.27	Визначення активності мієлопероксидази у нейтрофілах периферичної крові мишей	85
2.4.28	Дослідження функціонального стану Т-лімфоцитів в реакції бласттрансформації лімфоцитів мишей	86
2.4.29	Дослідження рівня специфічного антитілоутворення у відповідь на імунізацію протигрипозною вакциною мишей	86
2.4.30	Дослідження рівня продуктів перекисного окиснення ліпідів в кістковому мозку мишей	87
2.4.31	Статистичний аналіз отриманих експериментальних даних	88

РОЗДІЛ 3. ХАРАКТЕРИСТИКА ЕЕТП 9 ТА ЗАСТОСУВАННЯ МОДЕЛІ РАДІАЦІЙНО-ІНДУКОВАНОЇ ІМУНОДЕПРЕСІЇ ДЛЯ ОЦІНКИ ЙОГО ЕФЕКТИВНОСТІ

3.1	Концентрація білка та рівень FGFb в ЕЕТП 9 до та після кріовпливу	89
3.2	Спектр амінокислот та жирних кислот ЕЕТП 9	90
3.3	Концентрація ІЛ-2, синтезованого спленоцитами та фагоцитарна активність перитонеальних макрофагів мишей із циклофосфамідною імунодепресією під впливом цільного ЕЕТП 9 та його фракцій <i>in vitro</i>	92
3.4	Оцінка алергізуючих властивостей ЕЕТП 9	96
3.5	Вплив ЕЕТП 9 на показники виживаності мишей із радіаційною імунодепресією	98
3.6	Гістологічне дослідження органів імунної системи після введення ЕЕТП 9 мишам із радіаційною імунодепресією	100
3.6.1	Вплив ЕЕТП 9 на морфологію стегнової кістки тварин із радіаційною імунодепресією	100

- 3.6.2 Вплив ЕЕТП 9 на морфологію селезінки мишей із радіаційною імунодепресією 105
- 3.6.3 Вплив ЕЕТП 9 на морфологію тимусу мишей із радіаційною імунодепресією 109

РОЗДІЛ 4 ВІДНОВЛЕННЯ КЛІТИННОГО СКЛАДУ ОРГАНІВ ГЕМОПОЕЗУ ТА ІМУНОГЕНЕЗУ ПІД ВПЛИВОМ ЕЕТП 9 У МИШЕЙ ІЗ РАДІАЦІЙНОЮ ІМУНОДЕПРЕСІЄЮ 112

- 4.1 Нормалізація абсолютного числа каріоцитів кісткового мозку мишей із радіаційною імунодепресією під впливом ЕЕТП 9 112
- 4.2 Відновлення абсолютного числа каріоцитів тимусу мишей із радіаційною імунодепресією під впливом ЕЕТП 9 116
- 4.3 Відновлення абсолютного числа каріоцитів селезінки мишей із радіаційною імунодепресією під впливом ЕЕТП 9 117
- 4.4 Стан периферичної крові мишей із радіаційною імунодепресією під впливом ЕЕТП 9 119
- 4.5 Відновлення числа лімфоцитів та їх субпопуляцій в периферичній крові мишей із радіаційною імунодепресією під впливом ЕЕТП 9 127

РОЗДІЛ 5 ВМІСТ ЦИТОКІНІВ, РЕГУЛЯТОРІВ ГЕМОПОЕЗУ ТА ІМУНОГЕНЕЗУ, У МИШЕЙ ІЗ РАДІАЦІЙНОЮ ІМУНОДЕПРЕСІЄЮ ПІД ВПЛИВОМ ЕЕТП 9 134

- 5.1 Вміст цитокінів в супернатанті культивованих *in vitro* каріоцитів кісткового мозку у мишей із радіаційною імунодепресією за дії ЕЕТП 9 134
- 5.2 Вплив ЕЕТП 9 на вміст цитокінів, регуляторів гемопоезу та імуногенезу в сироватці крові мишей із радіаційною імунодепресією 142

РОЗДІЛ 6 ВІДНОВЛЕННЯ ФУНКЦІОНАЛЬНОЇ АКТИВНОСТІ КЛІТИН ІМУННОЇ СИСТЕМИ МИШЕЙ ІЗ РАДІАЦІЙНОЮ ІМУНОДЕПРЕСІЄЮ ПІД ВПЛИВОМ ЕЕТП 9	152
6.1 Вплив ЕЕТП 9 на відновлення специфічного антитілоутворювання за імунізації мишей із радіаційною імунодепресією	152
6.2 Вплив ЕЕТП 9 на відновлення функціональної активності Т- лімфоцитів у мишей із радіаційно-індукованою імунодепресією	156
6.3 Вплив ЕЕТП 9 на відновлення функціональної активності нейтрофілів периферичної крові мишей із радіаційно- індукованою імунодепресією	158
6.4 Рівень продуктів пероксидації ліпідів у кістковому мозку мишей із індукованою імунодепресією за дії ЕЕТП 9	168
АНАЛІЗ ТА УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕННЯ	172
ВИСНОВКИ	188
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ	189
ДОДАТОК 1	215

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

- АЛТ – аланінамінотрансфераза
АСТ – аспартатамінотрансфераза
АТФ – аденозинтрифосфат
АФП – альфа-фетопротеїн
ВІД – вторинний імунодефіцит
ГІМ – гемопоезіндукуюче мікрооточення
ГСК – гемопоетична стовбурова клітина
ГУТ – гіперчутливість уповільненого типу
ДК – дієнові кон'югати
ДЛЕ – діалізований лейкоцитарний екстракт
ЗТ-ПЛР – полімеразна ланцюгова реакція зі зворотною транскрипцією
ІД – імунодефіцит
КМ – кістковий мозок
КУО-ГМ – гранулоцитарно-макрофагальні колонієутворюючі одиниці
ЛПС – ліпополісахарид
МСК – мезенхімальні стовбурові клітини
РБТЛ – реакція бласттрансформації лімфоцитів
РГГА – реакція гальмування гемаглютинації
СІ – система імунітету
СК – стовбурові клітини
СКК – стовбурові кровотворні клітини
СРБ – С-реактивний білок
ТБК – тіобарбітурова кислота
ТК – трієнові кон'югати
НОР – надосадова рідина
ПОЛ – перекисне окиснення ліпідів
ФГА – фітогемаглютинін
Фі – фагоцитарний індекс

Фч – фагоцитарне число

Ig – immunoglobulin – імуноглобулін

IGF1 – insulin-like growth factor 1 – інсуліноподібний фактор росту 1

IFN- γ – interferon- γ – інтерферон- γ

IL – interleukin – інтерлейкін

CSF-1 – colony stimulating factor 1 – фактор стовбурової клітини

SCFR – stem cell factor receptor – рецептор фактора стовбурової клітини

c-Kit – tyrosine-protein kinase Kit – протеїнова тирозинкіназа Kit

EGF – epidermal growth factor – епідермальний фактор росту

FGF – fibroblasts growth factor – фактор росту фібробластів

FGFR – fibroblasts growth factor receptor – рецептор фактор росту фібробластів

Flt3-ligand – Fms-related tyrosine kinase 3 ligand – ліганд Fms-пов'язаної тирозин кінази 3

G-CSF – granulocyte-colony stimulating factor – гранулоцитарний колонієстимулювальний фактор

GM-CSF – granulocyte-macrophage colony-stimulating factor – гранулоцитарно-макрофагальний колонієстимулювальний фактор

M-CSF – macrophage colony-stimulating factor – макрофагальний колонієстимулювальний фактор

MIF – macrophage migration inhibitory factor – фактор інгібіції макрофагів

mRNA – messenger RNA – мРНК

NF- κ B – nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells – ядерний фактор – B

PDGF – platelet-derived growth factor – тромбоцитарний фактор росту

SDF-1 – stromal cell-derived factor 1 – рецептор хемоатрактанту

TGF- β – transforming growth factor beta – трансформуючий фактор росту β

TNF – tumor necrosis factor – фактор некрозу пухлини

ВСТУП

Актуальність теми. Вторинні (набуті) імунодефіцити – широко розповсюджені імунодепресивні стани, спричинені застосуванням лікарських засобів з імуносупресивною активністю (цитостатики, кортикостероїди, опіоїдні анальгетики тощо), крововтратами (в результаті травми, опіку або хірургічного втручання), довготривалими інфекційними (гепатити, герпетичні інфекції тощо) та асептичними (цукровий діабет, ревматоїдний артрит тощо) запальними захворюваннями, ультрафіолетовим випромінюванням, іонізуючою радіацією, порушеннями білкового харчування, нестачею в раціоні мікроелементів, таких як цинк та ін [1–5]. Зниження загальної імунної реактивності внаслідок набутого імунодефіциту ініціює низку патологічних станів, що являють собою суттєву загрозу для якості та тривалості життя людини [6, 7]. Наслідками скомпрометованої імунної реактивності є підвищена захворюваність на онкологічну патологію, інфекційні захворювання, метаболічні хвороби та багато інших [8–10].

Імунодепресивні стани різноманітного генезу частіше за все асоціюються з пошкодженням функціонування гемопоетичної системи, відповідальної за диференціювання та вихід у циркуляцію формених елементів крові [11]. Порушення медулярного гемопоєзу супроводжує пригнічення імунної реактивності з віком [12], а також вторинний імунодефіцит, викликаний ВІЛ-інфекцією [13]. Обов'язковою і вирішальною умовою лікування індукованих порушень імунної реактивності є відновлення супресованого кровотворення, яке залежить від глибини субпопуляційного спустошення та/або ступеня функціонального ушкодження гемопоетичних і лімфоїдних елементів [14].

Для відновлення супресованої імунної реактивності використовують замісну терапію або неспецифічні імуномодулятори [15, 16]. Зважаючи на те, що на вторинні імунодефіцитні стани страждає значна частина людей у всьому світі пошук та розробка засобів для відновлення супресованої імунної реактивності є

актуальним завданням сучасної імунології, імунореабілітації та імунобіотехнології [17].

На сьогоднішній день серед засобів із відновлювальними ефектами щодо гемо- та імунопоезу вирізняються препарати з ембріональних тканин тваринного походження, які є складними комплексами біохімічно активних сполук з широким спектром біологічної дії, до складу яких входять білки, пептиди, вільні амінокислоти, жирні кислоти, РНК, ДНК, цитокіни (зокрема, інтерлейкін-3, гранулоцитарний-, макрофагальний- та гранулоцитарно-макрофагальний колонієстимулювальні фактори, лектини тощо) [18, 19]. Препарати з ембріональних тканин здатні активувати проліферацію та диференціювання клітин імунної системи, прискорювати процеси регенерації [20], посилювати фагоцитарні властивості лейкоцитів, впливати на інтегральні метаболічні процеси, справляти антистресовий та антитоксичний ефекти [21]. У число таких препаратів входять екстракти тканин ембріонів птахів, у тому числі 8-9 діб розвитку, оскільки у цьому періоді у них накопичується максимальна кількість різних ростових та диференціювальних факторів (зокрема, G-CSF, IL-1, IL-3, FGF) [22]. Екстракти курячих ембріонів широко застосовуються як джерело факторів диференціювання для культивування *in vitro* нейрональних, нейроепітеліальних та ембріональних стовбурових клітин [23]. У медичній практиці екстракти курячих ембріонів застосовуються для відновлення зниженої імунної реактивності у післяпологовому періоді [18]. На тваринних моделях показана здатність екстрактів курячих ембріонів стимулювати репаративні імунні реакції [24]. Однак, незважаючи на зареєстрований широкий спектр імуномодуляторних властивостей, вплив екстрактів курячих ембріонів на супресовані гемо-, імунопоез та імуногенез залишається практично недосліджений.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Робота виконана у відповідності до науково-дослідної теми Державної установи «Інститут мікробіології та імунології ім. І.І. Мечникова Національної академії медичних наук України» «Експериментальне обґрунтування тактики корекції

порушень антиінфекційної резистентності на моделі радіаційно-індукованого імунодефіциту» (№ д/р 0106U003263).

Мета і задачі дослідження. Метою роботи було дослідити вплив екстракту з ембріональних тканин птахів 9 діб розвитку (ЕЕТП 9) на процеси гемо-, імунопоезу та імуногенезу за індукованої імунодепресії.

Для досягнення мети було поставлено такі задачі:

1. Визначити концентрацію білка та FGFb у складі ЕЕТП 9 до та після кріовпливу.
2. Порівняти вплив ЕЕТП 9 та його фракцій на синтез ІЛ-2 спленоцитами та фагоцитарну активність перитонеальних макрофагів мишей із циклофосфамідною імунодепресією *in vitro*.
3. Провести оцінку впливу ЕЕТП 9 на виживаність мишей умовах радіаційного впливу в діапазоні доз 3 – 9 Гр.
4. Дослідити вплив ЕЕТП 9 на морфологічний стан кісткового мозку, тимусу та селезінки у тварин із радіаційною імунодепресією (5 Гр).
5. Провести порівняльну оцінку імуномодуляторних властивостей ЕЕТП 9 та офіціального препарату «Ербісол» на моделі радіаційної імунодепресії.

Об'єкт дослідження – імуномодуляторні властивості ЕЕТП 9, щодо гемо-, імунопоезу та імуногенезу в умовах індукованої імунодепресії.

Предмет дослідження – кількісні та функціональні характеристики каріоцитів органів гемопоезу та імунокомпетентних клітин периферичної крові за дії ЕЕТП 9 в умовах індукованої імунодепресії.

Методи дослідження – біохімічні, гематологічні, гістологічні, імунологічні, мікробіологічні, статистичні.

Наукова новизна отриманих результатів. Доповнено наукові дані щодо реконститутивних властивостей препаратів з ембріональних тканин тваринного походження. Вперше показано здатність ЕЕТП 9 до швидкого і повноцінного відновлення морфологічної структури органів імунної системи (кісткового мозку, тимусу, селезінки), фенотипового складу лімфоїдного компартменту кісткового

мозку та зниження рівня продуктів пероксидації ліпідів у мієлокаріоцитах, відновлення популяційного і субпопуляційного складу та функціональної активності лейкоцитів периферичної крові за умов індукованої імунодепресії. Доведено перевагу ЕЕТП 9 над офіційним ембріональним препаратом «Ербісол», яка полягає у скороченні терміну відновлення процесів кровотворення та функціонального стану клітин вродженого та адаптивного імунітету у тварин з індукованою імунодепресією.

Розширено існуючі уявлення щодо впливу препаратів з ембріональних тканин тваринного походження на синтез і секрецію цитокінів. Встановлено здатність ЕЕТП 9 стимулювати продукцію мієлокаріоцитами цитокінів, що регулюють гемопоез (G-CSF, Flt3-ligand та IL-6) у кістковому мозку. Виявлено підвищення сироваткових рівнів цитокінів – регуляторів імунних реакцій (IL-1 β , IL-4 та IL-6) за впливу ЕЕТП 9 в ранні строки після індукції імунодепресії без явища їх пролонгованої гіперпродукції в динаміці.

Отримано нові дані про спектр амінокислот та жирних кислот ЕЕТП 9. Вперше визначено кількісний вміст фактору росту фібробластів 2 (FGFb) у складі ЕЕТП 9.

Практичне значення одержаних результатів. Проведені дослідження надають експериментальне обґрунтування доцільності застосування екстракту з ембріональних тканин птахів 9-ти діб розвитку з метою прискореного відновлення гемопоезу та функціонального потенціалу імунної системи з наданням йому повноцінного і стабільного характеру в умовах індукованого імунодефіциту. Результати дослідження можуть слугувати обґрунтуванням для клінічного випробування ефективності використання ЕЕТП 9 за набутих розладів гемопоезу та імуногенезу.

За матеріалами дисертації створено «Технологію отримання екстракту з ембріонів курей, що володіє імуномодулюючими властивостями» та отримано патент на корисну модель «Отримання екстракту з ембріонів курей», № 85646 від 25.11.2013 р.

Наукові положення дисертації впроваджені у навчальний курс кафедри загальної і клінічної імунології та алергології Харківського національного університету ім. В.Н. Каразіна МОН України та кафедри клінічної мікробіології та імунології Харківської медичної академії післядипломної освіти МОЗ України.

Особистий внесок здобувача. Автором особисто проведено інформаційний пошук, проаналізовано фахові наукові публікації за темою дисертації, аргументовано робочу гіпотезу дослідження, проведено експериментальні дослідження та статистичний аналіз одержаних результатів, проведено їх узагальнення з подальшим оформленням у вигляді наукових публікацій, сформульовано висновки, написано та оформлено усі розділи дисертації. Визначення мети, задач дослідження, розробка методичних підходів, розробка дизайну дослідження та формулювання висновків здійснено спільно з науковим керівником. Автор вдячний за допомогу у реалізації експериментальної роботи із залученням γ -випромінювання д.м.н., проф. Сімоновій-Пушкар Л.І. (ДУ «Інститут медичної радіології ім. С.П. Григор'єва НАМН України», м. Харків), за допомогу в дослідженні метаболічної активності нейтрофільних гранулоцитів д.б.н., проф. Перському Є.Є. (Харківський національний університет ім. В.Н. Каразіна), за допомогу в розробці екстракту з ембріональних тканин птахів д.б.н., проф. Жегунову Г.Ф. (Харківська зооветеринарна академія), за допомогу в оцінці біохімічного складу екстракту з ембріональних тканин птахів науковому співробітнику Шаповалову С.О. (Випробувальний центр Інституту тваринництва НААН України).

Здобувач вдячний за допомогу у проведенні досліджень колегам, співучасть яких у виконанні роботи відмічена у спільних публікаціях.

Апробація результатів дисертації. Основні положення дисертації оприлюднено і обговорено на: научно-практичеської конференції с міжнародним участієм «Актуальные вопросы биологии, экологии, медицины и фармакологии» (м. Дніпропетровськ, 2013 р.); III Международной научной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых «Фундаментальные и прикладные исследования в биологии» (г. Донецк, 2014 г.); міжнародній науково-

практичній конференції «Теоретичні та практичні аспекти розвитку сучасної медицини» (м. Львів, 2014 р.); міжнародній науково-практичній конференції «Медична наука та практика: актуальні питання взаємодії» (м. Київ, 2014 р.); міжнародній науково-практичній конференції «Сучасні тенденції у медичних та фармацевтичних науках» (м. Київ, 2014 р.); міжнародній науково-практичній конференції «Пріоритети сучасної медицини: теорія і практика» (м. Одеса, 2015 р.); науково-практичній конференції з міжнародною участю «Щорічні терапевтичні читання: від досліджень до реалій клінічної практики XXI століття» присвяченій пам'яті академіка Л.Т. Малої (м. Харків, 2015 р.); науково-практичній конференції за участю міжнародних спеціалістів «Актуальні питання боротьби з інфекційними захворюваннями», присвяченій 170-й річниці з дня народження І.І. Мечникова, (м. Харків, 2015 р.); міжнародній науково-практичній конференції «Проблеми та стан розвитку медичної науки та практики в Україні», (м. Дніпро, 2016 р.).

Публікації. За результатами дослідження опубліковано 23 наукові праці, серед яких 1 – патент на корисну модель, 9 статей у вітчизняних фахових наукових виданнях, затверджених переліком МОН України (з них 1 – у виданні, що входить до міжнародної науко метричної бази даних SCOPUS), 12 – тез доповідей, 1 технологія.

Структура і обсяг дисертації. Дисертаційна робота складається зі вступу, огляду літератури, розділу матеріали і методи дослідження, 4 розділів результатів власних досліджень, розділу аналізу та узагальнення результатів досліджень, висновків, списку використаних літературних джерел, який містить 228 посилань, з яких 128 – латиницею, 100 – кирилицею). Матеріали дисертаційної роботи викладені на 220 сторінках (з яких основна частина займає 169 сторінок), ілюстровані 36 рисунками, 12 таблицями та 7 схемами.

РОЗДІЛ 1

ПРОБЛЕМА ІНДУКОВАНОЇ ІМУНОДЕПРЕСІЇ ТА ШЛЯХИ ЇЇ ПОДОЛАННЯ

1.1 Фактори розвитку імунодепресивних станів

Структурна та функціональна організація організму підтримується інтегрованою регуляцією роботи всіх його органів та систем, із безпосереднім взаємозв'язком з оточенням існування [25]. Останнє, поряд із життєво необхідними ресурсами, здатне виступати джерелом хвороботворних чинників, негативна, а часом і деструктивна дія яких не оминає своєю увагою чутливу систему імунітету – головного гаранту тривалості та якості життя.

Дефекти системи імунітету об'єднуються загальним поняттям імунопатологія, яка лежить в основі патогенезу багатьох захворювань. В її структурі розрізняють наступні види: алергічні, аутоімунні, лімфопроліферативні, інфекційні, онкологічні та імунодефіцитні. В імунологічному статусі чутливого до дії несприятливих факторів організмі можуть виникати транзиторні імуномодуляції, які за дії додаткових різноманітних антигенних впливів можуть набути стійкості. В організмі, що реагує інтенсивно ці впливи формують алергічні реакції (40 % випадків) й аутоалергії (25 %), в організмі з низькою інтенсивністю реакції – імунодефіцити (близько 25 %) та пухлинні процеси. Усі види імунопатології є наслідком порушення взаємодії клітин системи імунітету з іншими клітинами чи їх активними молекулярними продуктами, що має наслідком запальні, неопластичні процеси чи процеси апоптозу [26].

Імунодефіцити (ІД) – порушення нормального імунного статусу, що обумовлені дефектом одного або декількох механізмів імунної відповіді. Первинні (вроджені) ІД, як відомо, часто генетично обумовлені та пов'язані з відсутністю або зниженням активності генів, що контролюють дозрівання імунокомпетентних клітин або з патологією антенатального розвитку. Первинні ІД розповсюджені не досить широко на відміну від вторинних ІД, що виникають під впливом

несприятливих ендо- та екзогенних факторів постнатального періоду розвитку організму [27].

Отже, вторинні імунодефіцити (ВІД) є групою захворювань, в основі яких лежать порушення окремих ланок імунітету, чи комплексне пошкодження системи під впливом зовнішніх чинників чи патологічних процесів, що за своєю етіологією не пов'язані з імунною системою, але здійснюють на неї пригнічуючий вплив, що має наслідком нездатність організму до розвитку повноцінної імунної реакції. Клінічні прояви ВІД досить добре охарактеризовані [28, 29].

Сучасними причинами формування ВІД слугують хронічні, гострі бактеріальні (туберкульоз, бруцельоз, сифіліс та ін) й вірусні інфекції (цитомегаловірус, вірус Епштейна-Барр, кір, гепатит тощо), а також паразитарні інвазії, хронічний стрес та перевтома, довготривалий прийом деяких лікарських препаратів, забруднення зовнішнього середовища, іонізуюче й надвисокочастотне випромінювання, злоякісні новоутворення, аутоімунні та ендокринні захворювання, порушення харчування, тяжкі травми, опікова хвороба й оперативні втручання, трансплантація органів із супроводжувальною імуносупресивною терапією, спленектомія тощо [29].

Загальною рисою описаних вище чинників є комплексний негативний вплив на всі системи організму, в тому числі й на імунну. Деякі фактори, зокрема, іонізуюче випромінювання, здійснюють інгібуючий вплив на імунітет, що пов'язаний з пригніченням чи навіть деструкцією системи кровотворення [30]. Відомим є той факт, що критичною структурою, наприклад, при променевих ураженнях на органному рівні виступає кістковий мозок, на тканинному – стовбурові кровотворні клітини (СКК) [31, 32].

Встановлено, що відновлення гемопоетичних клітин кісткового мозку визначається процесами проліферації та диференціювання клітин-попередників, що зазнали малого ушкодження або непошкоджені взагалі. Тому при критичних ушкодженнях гемопоезу, що супроводжують онкогематологічні стани або високодозові радіаційні впливи, трансплантація кісткового мозку залишається єдиним радикальним методом лікування [33]. Звідси сучасні дослідження у

контексті корекції та профілактики дії ушкоджуючих імунопатологічних факторів спрямовані на пошук засобів прискорення процесів відновлення механізмів клітинної репарації, зокрема, в кровотворному пулі [30]. Взаємодія між гемопоезом, фізіологічним чи патофізіологічним станом організму й оточуючим середовищем регулюється нейрогуморальною системою шляхом впливу індукторів та інгібіторів диференціювання й проліферації, гормонів, мікроелементів, органічних кислот, пептидів тощо.

Локальна регуляція забезпечує підтримання на певному рівні загального числа СКК та відповідність інтенсивності гемопоезу потребам, що виникають у конкретний момент часу. При стабільному стані у гемопоетичній системі присутні чисельні кровотворні попередники, які ще не вичерпали свій проліферативний потенціал і здатні до негайної та інтенсивної проліферативної відповіді в умовах кількісних втрат в циркуляторному руслі. При зниженні інтенсивності гемопоезу вивільняється один чи декілька факторів, які активують зрілі попередники, що веде до швидкого відновлення відповідних клітинних типів. За необхідності компенсації значних крововтрат включаються додаткові фактори, що запускають проліферацію і диференціювання стовбурових клітин. Кількість активованих СКК визначається різноманітністю, і, можливо, кількістю факторів, що вивільнились [34]. Отже, не має сумніву у важливості повноцінного, адекватно регульованого процесу гемопоезу, що створює передумови для здійснення подальшого імуногенезу.

Значна роль у забезпеченні регуляції кістковомозкового гемопоезу відводиться мікрооточенню СКК – гемопоезіндукуючому мікрооточенню (ГІМ) [35, 36]. ГІМ є сукупністю місцевих умов, що є необхідними для забезпечення проліферативної та диференціальної спроможності СКК. Як відомо, ГІМ представлено комплексом клітинних елементів: Т-лімфоцити, резидентні макрофаги, фібробласти, стромальні механоцити, адипоцити, ендотеліальні клітини, остеобласти; комплексом таких екстрацелюлярних та гуморальних факторів, як колагенові волокна, фактори росту, цитокіни, пептиди, фактори адгезії (глікопротеїди та протеоглікани), що продукуються вказаними клітинними

елементами, які розташовані в безпосередній близькості від гемопоетичних клітин; нервовими закінченнями (адрен- та холінергічні) [37, 38]. Так, ГІМ здійснює контроль через синтез гуморальних факторів й безпосередній контакт з гемопоетичними стовбуровими клітинами (ГСК) з метою забезпечення процесів гемопоезу необхідними речовинами, а також представлення гемопоетичних факторів в доступній формі. Основна частина клітинних елементів ГІМ походять від мультипотентних мезенхімних стовбурових клітин (МСК), основним джерелом яких є кістковий мозок. МСК конститутивно та індукцибельно продукують гемопоетичні, негемопоетичні ростові фактори, інтерлейкіни й хемокіни, а на МСК-попередниках експресуються рецептори для деяких цитокінів та ростових факторів [39]. Клональний ріст МСК підтримується фактором росту фібробластів-2 (FGF2). Так, показано, що за індукції мітогеном лаконоса стромальні стовбурові клітини миші продукують гранулоцитарно-макрофагальний колонієстимулювальний фактор (GM-CSF). У стандартному Northern blot аналізі показано синтез mRNA фактору стовбурових клітин (CSF-1), гранулоцитарно-макрофагального колонієстимулювального фактору (GM-CSF), гранулоцитарного колонієстимулювального фактору (G-CSF), c-kit ligand (KL), та IL-6, але не IL-3, IL-4, чи IL-5 у 3-тижневій опроміненій та неопроміненій Декстерівській культурі стромальних клітин кісткового мозку миші. mRNA IL-3 відстежується у опроміненних стромальних клітин в культурі лише методом полімеразної ланцюгової реакції зі зворотною транскрипцією (ЗТ-ПЛР). Продукція цих факторів росту та інтерлейкінів може пояснити підтримку гранулоцитів, макрофагів, мегакаріоцитів й СК в культурі Декстерівського типу кісткового мозку миші [40].

Р. Чайлахян зі співавторами встановили, що гетеротропна трансплантація штамів кістковомозкового походження, сформованих різними клонами стромальних попередників, призводила до перенесення кістковомозкового мікрооточення і утворення в зоні трансплантації нового кровотворного органу. Так, було показано, що частина клонів стромальних клітин здатна формувати кісткову тканину і водночас забезпечувати стромальне гемопоетичне

мікрооточення відразу для трьох паростків кістковомозкового кровотворення: еритроїдного, мієлоїдного і мегакаріоцитарного, створюючи при цьому досить великі плацдарми кровотворної тканини і деяку кісткову масу [41]. Стромальні клітини фетальних та неонатальних гемопоетичних органів миші здатні підтримувати кровотворення в тривалій культурі, при чому продукція гранулоцитарно-макрофагальних-колонієутворюючих одиниць (КУО-ГМ) у ній відображає рівень КУО-ГМ в органі, що був джерелом цієї культури [42]. О. Щегельська й співавтори доводять, що в локальних тканинних зонах відбувається сигнально-регуляторна взаємодія між некомітованими і комітованими стромальними клітинами-попередниками, а також між ними й оточуючими зрілими клітинами [43]. Передбачається, що індукція диференціювання здійснюється паракринними регуляторними факторами мезенхімного і немезенхімного походження (фактори росту, ейкозаноїди, молекули екстрацелюлярного матриксу), які забезпечують просторові та часові зв'язки в мікрооточенні мультипотентних мезенхімних клітин-попередників. Компонентами екстрацелюлярного матриксу, які продукуються МСК-попередниками є фібронектин, ламінін, синдекан, колагени та протеоглікани, а також CD44 (рецептор гіалуронана і остеопонтіна), що відіграють основну роль в організації міжклітинної взаємодії та формуванні позаклітинного матриксу в кістковому мозку і кістковій тканині та забезпечують індуктивними й регуляторними сигналами не тільки МСК, але і гемопоетичні попередники та інші немезенхімні СК кісткового мозку. Саме тому в культурі мережа стромальних прогеніторних клітин служить фідерною основою для розвитку всіх клонів гемопоетичних клітин.

Створення достатнього кровотворного мікрооточення забезпечується певним рівнем регенерації стромальної тканини, чисельність же кровотворних клітин зростає за розширення стромального плацдарму, придатного для гемопоезу. Кількість відомих мітогенних факторів, що стимулюють проліферацію та синтез цитокінів стромальними клітинами-попередниками, обмежена. До таких належать тромбоцитарний фактор росту (PDGF), епідермальний фактор росту (EGF),

фактор росту фіброblastів (FGF), трансформуючий фактор росту β (TGF- β), а також інсуліноподібний фактор росту 1 – IGF1. В деяких випадках продукція стромою кровотворних цитокінів стимулюється також IL-2, IL-4, IL-6, IL-7 [44, 45]. Деякі із цих стимуляторів, а саме IL-1, IL-2, IL-4, IL-6, IL-7, TGF- β , власне продукуються клітинами стромы КМ, тобто можуть діяти аутокринним чи паракринним чином.

Взаємодіям стромальних і кровотворних клітин не властивий однобічний характер, так, існує вплив не тільки стромы на гемопоез, а і останнього на строму кісткового мозку. Культивування разом із кровотворними клітинами індукує продукцію G-CSF стромальними клітинами лінії MC 3T3-G2/PA6 і значно посилює секрецію IL-6 остеобластами [46]. У першому випадку цей ефект спостерігається лише за безпосереднього контакту кровотворних клітин зі стромальними, у другому, він не потребує такого контакту і опосередкований, ймовірно, певними розчинними факторами (але не IL-1 і TNF).

Самі ж культури стромальних клітин органів гемопоезу продукують IL-1,-2, -4, -5, -7, -8, -11, інтерферони та фактори росту пре-B-клітин. За низки випадків показано кореляцію між продукцією стромальними клітинами тих чи інших факторів і здатністю цих клітин до підтримки кровотворення [47, 48]. Однак в інших випадках такої кореляції не спостерігається: лінії стромальних клітин, що виробляють один і той же набір цитокінів, відрізняються за ефективністю підтримки кровотворення [49]. На думку Gibson F. зі співавт., це може бути пов'язано із тим, що багато цитокінів продукуються стромою локально на низькому рівні й концентрації їх у супернатанті можуть не відображати біологічно активні рівні під час взаємодії стромальних клітин із кровотворними [50].

Морфологічно більшість зрілих клітин стромы кісткового мозку, що здатні підтримувати гемопоез, представлена фіброblastами, що синтезують колаген I та III типів, низку цитокінів та факторів росту [51]. Зокрема, фіброblastами секретуються високі рівні IL-1, G-CSF, GM-CSF і M-CSF. У тривалій культурі вони продукують фактор стовбурових клітин (фактор Стілла) SCF і IL-6, але не IL-3 і не GM-CSF і підтримують проліферацію ранніх кровотворних клітин [52].

Останнім часом розглядається роль фактору росту фібробластів (FGF) у регуляції кровотворення та інших фізіологічних процесів.

FGF є родиною секретованих молекул поліпептидної природи, які діють шляхом активації специфічних тирозинкіназних рецепторів. FGF-рецептори (FGFR), що здійснюють трансдукцію сигналу опосередковано активацією різних шляхів, включно Ras/MAP кінази й фосфоліпази-С гамма шляхів.

FGF є родиною білків, що зв'язують гепарин. Зокрема, FGF-1 (кислий), FGF-2 (bFGF) (основний), онкобілки int-2 (FGF-3) й hst (FGF-4), FGF-5, фактор росту кератиноцитів, фактор росту ендотелію судин та інші фактори. Виняткову роль FGF грає в ембріогенезі. Автори вказують, що значна більшість мишей нокаутованих за геном FGF гинуть в ембріональному чи ранньому постнатальному періоді, а миші, які вижили мають значні фенотипічні зміни. Порушення регуляції зв'язування FGF з FGFR в ембріональному періоді, зокрема, може призводити до карликовості [53]. Це вказує на виключну важливість генів цих факторів в ембріональному розвитку. Подібні експерименти проведені і на *Brachydanio rerio* (zebrafish), які доводять спільність здійснюваних генами FGF ефектів у зовсім різних класів тварин [54].

Так, члени сімейства FGF беруть участь в регуляції багатьох процесів ембріонального та постембріонального розвитку, включно структурування, морфогенез, диференціацію, проліферацію та виживання кліти, їх міграцію [55]. Показано, що більшість представників родини FGF регулює вказані процеси паракринним та/або аутокринним чином, але для деяких з них існує також ендокринний шлях регуляції метаболізму [54]. FGF є мітогенами для великої кількості різних типів клітин, зокрема, нейроектодермального та мезенхімного походження, потентні в якості стимуляторів ангіогенезу, стимулюють також диференціювання клітин нейронального типів *in vitro* та *in vivo* [56]. Синтез та секреція FGF фібробластами, що активно діляться, відіграє важливу роль у індукції ангіогенезу в процесі репарації ран.

Основний фактор росту фібробластів – bFGF, зокрема, стимулює проліферацію ендотеліальних клітин шляхом активації серин/треонінової

протеїнкінази – raf1 та опосередковує організацію ендотеліоцитів в капіляроподібні структури. bFGF грає важливу роль в процесах стимуляції проліферації спільного попередника гемопоетичних та ендотеліальних клітин – гемангіобластів, що беруть початок від ембріональних стовбурових клітин [57–59]. Крім того, bFGF регулює процеси кровотворення, керуючи виживаністю ГКС. Різноманітні дефекти, що пов'язані з пригніченням функції bFGF, призводять до зниження виживаності кровотворних клітин, а також порушення процесів формування їх колоній [60]. Активуючи ендотеліальні клітини в кістковому мозку, bFGF спричинює синтез G-CSF, IL-6, IL-8.

Однозначна роль FGF та їх рецепторів в регуляції нормальних ГСК невідома. Однак, показано, що в кістковому мозку мишей стовбурові клітини, що довготривало репопулюють, знаходяться виключно в FGFR⁺ фракції клітин. Стівбуровим клітинам, що ступили на шлях диференціації у комітовані попередники властиве зниження експресії FGF-рецептора (FGFR). Довготривала культура клітин кісткового мозку у безсироватковому середовищі з додаванням лише FGF-1 характеризувалася підвищенням кількості мультилінійних гемопоетичних клітин, здатних до послідовного перевивання та довгострокової репопуляції. Результати цих дослідів показують, що мультипотентні властивості СК залежать від сигналіngu опосередкованого FGF-рецептором, а також демонструють важливу роль FGF-1 в гомеостазі ГСК [61]. В роботі інших зарубіжних авторів продемонстровано [62], що сигналінг через FGF сприяє росту *in vitro* ГСК та прогеніторних СК (клітин-попередників), а також досліджено експресію FGFR1 та його функції у сприянні росту прогеніторних СК *in vivo*. Вони спостерігали активізацію ядерного фактору В (NF-κB) та CXCR4 та рецептору до хемоатрактанту SDF-1 у прогеніторних клітин у відповідь на кістковомозкове ураження фторурацилом у контролі, чого не відбувалося у мишей нокаутуваних за геном FGFR-1, яким властиві відповідні дефекти в проліферації та міграції прогеніторних клітин. Так, мегакаріоцити шляхом секреції FGF-1 та FGF-2 підтримували відновлення прогеніторних СК, коли ріст та продукція ними FGF посттравматично були значно зниженими при блокаді FGF-FGFR сигналіngu.

Дане дослідження вперше показує, що FGF-сигналінг полегшує відновлення пошкодженої системи гемопоезу у мишей шляхом активації проліферації та сприяння мобілізації прогеніторних ГСК *in vivo*.

Показано також, що порушення FGF-сигналінгу у людини призводять до реалізації спадкових хвороб та онкопроцесів різноманітної локалізації [54]. Було виявлено здатність представників родини FGF виступати тригером індукції сигналу апоптозу, зокрема, в трансформованих клітинах. Аутокринна дія цих факторів, вірогідно, є відстежуваною оточуючими нетрансформованими клітинами та викликає апоптоз-індукуючий ефект, що таким чином попереджає виживання та потенційний розвиток пухлинних клітин [63].

1.2 Профілактика та корекція імунологічних порушень при депресії кровотворної та імунної систем. Біопрепарати

Для лікування захворювань з порушеннями імунітету застосовуються різноманітні фармакологічні препарати, зокрема, засоби імунотерапії. Імунотерапія має на меті делецію клонів, формування толерантності або імунну девіацію (переключення одного типу імунної відповіді на інший) [64].

Основні відомі на сьогодні принципи функціонування імунної системи слугують базою для 6 основних груп імунотропних препаратів, що застосовуються у сучасній імунотерапії: мікробні, тимічні, кістково-мозкові, цитокіни, нуклеїнові кислоти й хімічно-синтезовані препарати [65]. Таким чином, імунотерапія не є етіотропною, тобто імунологічно неспецифічна.

Нині досліджено велику кількість речовин мікробного, рослинного, тваринного і синтетичного походження, розроблено на їх основі терапевтичні та профілактичні засоби, що впливають, зокрема, на вроджений імунітет [66–69].

1.2.1 Імуномодуляторні препарати мікробного походження, що застосовують для профілактики та корекції імунологічних порушень

Відомими мікробними препаратами в імунотерапії є лізати бактерій «Бронхомунал», «Імудон» та препарати, що вміщують рибосоми бактерій «Рибомуніл», за умов застосування яких відбувається поліклональна стимуляція Т- і В-лімфоцитів, що викликають продукцію специфічних сироваткових та секреторних антитіл. Поряд із тим, за рахунок протеогліканів, які входять до складу препарату, відбувається стимуляція вродженого імунітету: посилення фагоцитарної активності макрофагів і поліморфно-ядерних клітин, підвищення синтезу інтерферонів, інтерлейкінів (IL-1, -6 і -8). Активація моноцитів і макрофагів призводить до синтезу ними низки цитокінів: IL-1, IL-3 тощо [70].

Бактеріоімунотерапія є невід'ємною частиною лікування наслідків цитостатичної, променевої та антибіотикотерапії, що можуть супроводжуватися дисбіозами. Недостатність продукції нормальною флорою необхідних біологічно активних речовин, зокрема, вітамінів В₁₂ та фолієвої кислоти може спричиняти формування імунодефіцитного стану. Грампозитивні лакто- та біфідобактерії стимулюють протиінфекційний та протипухлинний імунітет, індукують толерантність при алергічних реакціях, безпосередньо викликають помірний синтез цитокінів: TNF- α , IL-12, IFN- γ , IL-10, TGF- β . Як наслідок відбувається посилення синтезу IgA. Короткий перелік цих препаратів: Біфідумбактерин сухий, Біфіліз, Біфіформ, Аципол, Ацилакт, біомаса ацидофільних лактобактерій Наріне, Лінекс, Колібактерін сухий, Бактиспорин, Біоспорін, Ентерол-250; препарати метаболітів бактерій – Хілак форте, Гастрофарм, тощо [71–73].

Широко застосовуються препарати нуклеїнових кислот. Нуклеїнат натрію – натрієва соль нуклеїнової кислоти стимулює синтез нуклеїнових кислот (ДНК та РНК), проліферацію та диференціацію клітин, а отже застосовується для стимуляції лейкопоезу та активації клітин КМ. Володіє здатністю стимулювати фактори як вродженого, так і набутого імунітету. До даної групи препаратів належать також нуклеїнові кислоти, що одержані з молоків осетрових риб:

«Деринат» – натрієва сіль нативної ДНК та «Полідан» – високоочищена суміш натрієвих солей ДНК і РНК. Також «Рідостін» – РНК, виділена з пекарських дріжджів. На основі нуклеїнових кислот розроблено низку синтетичних препаратів: «Полудан» – комплекс поліаденіл-уріділової кислоти. Також до цієї групи відносять синтетичні препарати нуклеїнових кислот, зокрема, «Інозин пранобекс», «Метилурацил» й «Рибоксин». Загальною характеристикою дії препаратів даної групи є виражена здатність до індукції інтерферону. Однак, слід зауважити, що ці засоби індуюють ріст і розмноження як еукаріотичних, так і прокаріотичних клітин. Так, для нуклеїнату натрію показана можливість стимуляції росту й розмноження бактерій [74–77].

1.2.2 Рекombінантні препарати цитокінів, що застосовують при корекції дефіцитів гемопоезу та імуногенезу

На теперішній час інтенсивно досліджуються роль та участь цитокінів у регуляції імунопоезу. Низка цитокінів є основою для створення великої групи як природних, так і рекombінантних імуномодуляторних препаратів та знайшла застосування в терапії вторинних імунопатологій, зокрема, асоційованих із порушеннями гемопоезу. Припускають, що дія цитокінів пов'язана із індукцією білків гострої фази, перехопленням радикалів і деякою активацією відновлення гемопоезу та гормональної регуляції [78, 79]. Так, ІЛ-1 визначено як ранній гемопоетичний фактор, який в кістковому мозку є продуктом компонентів ГІМ, а саме резидентних макрофагів, стромальних механоцитів, ендотеліальних клітин, адипоцитів і є стимулятором нейтрофілів, моноцитів, еозинофілів, базофілів, мегакаріоцитів та в деякій мірі еритроцитів [80].

G-CSF, як і GM-CSF виконує роль мобілізатору гемопоетичних СК [81, 82] та застосовується для профілактики фебрильної нейтропенії при гематологічних онкозахворюваннях, зокрема, лімфомах [83, 84]. Для пацієнтів, що зазнали високодозової хіміо- та радіотерапії, з метою заміщення та захисту гемопоетичної та імунної систем широко застосовуються заходи трансплантації гемопоетичних

стовбурових клітин. На ранніх етапах для вирішення цих задач джерелом ГСК слугував кістковий мозок, надалі після відкриття здатності ГСК до мобілізації до периферичної крові під впливом деяких агентів, стало можливим отримання цих клітин з циркуляторного русла без застосування травматичних та небезпечних маніпуляцій. Останнє, і є джерелом ГКС, що призначені для трансплантації у 90 % випадків терапевтичної замісної практики. Першими засобами, що були здатні викликати мобілізацію ГСК виявилися саме цитостатичні препарати, які призводили до абляції клітинності КМ та примушували ГКС, що залишилися до репопуляції кісткового мозку. Надалі було встановлено, що низка гемопоетичних ростових факторів, зокрема, G-CSF здатні до мобілізації ГКС, який саме і став препаратом вибору за для вирішення поставленої задачі. Однак, останніми роками спостерігається ріст числа пацієнтів-донорів при трансплантації, ГКС яких не відповідають мобілізацією на цей агент, у аутологічних донорів відсоток відповіді взагалі досягає 40 % у залежності від кількості та інтенсивності попередніх хіміо- та радіотерапевтичних заходів [85].

Також для мобілізації ГСК у периферичну кров застосовується низка таких цитокінів, як IL-1, IL-3, IL-6, IL-8, SCF, Flt-3-ligand, тромбопоетин, еритропоетин та особливо ефективні комбінації GM-CSF з IL-3 й Flt3-ligand з GM-CSF [86]. До першої групи цитокінових препаратів, що застосовуються на сьогодні належать Лейкінферон й Суперлімф, до другої – Беталейкін, Ронколейкін і Лейкомакс. Лейкінферон є комплексом цитокінів, який отримують за індукції лейкомаси здорових донорів вакцинним штамом вірусу хвороби Н'юкастла. Препарат містить IL-1, IL-6, IL-8, фактор інгібіції макрофагів (MIF), TNF, комплекс IFN- α . Суперлімф також є комплексом природних цитокінів, що продукуються за індукції мононуклеарів периферичної крові свиней ФГА. Препарат містить IL-1, IL-2, IL-6, IL-8, TNF, MIF, TGF- β та призначається здебільшого місцево і використовується для локальної імунокорекції. Ронколейкін – рекомбінантний IL-2, що є одним з центральних регуляторних цитокінів імунної системи людини. Беталейкін – лікарська форма рекомбінантного IL-1 β , що відіграє важливу роль в активації

факторів вродженого імунітету, розвитку запалення і на перших етапах імунної відповіді [65].

Різноманітні види інтерферонів підвищують загальний опір організму, що з відомою долею успіху використовується при лікуванні хронічних вірусних та бактеріальних інфекцій, онкологічних процесів, в неврологічній практиці [87–91].

Треба зазначити, що поряд із достатнім очікуваним терапевтичним ефектом, застосування цитокінів може викликати такі побічні реакції, як запалення у формі лихоманки та міальгії [92]. Часті також прояви легкої лейкопенії й підвищення активності амінотрансфераз у сироватці.

1.2.3 Природні препарати тваринного походження, що знайшли застосування у корекції порушень гемопоезу та імуногенезу

Серед засобів імунотерапії на увагу заслуговують клітинні препарати ксеноорганного походження та продукти їх функціональної активності [93, 94]. Сутність клітинної та тканинної терапії полягає в активації компенсаторних ресурсів пошкоджених клітин та тканин, стимуляції механізмів відновлення й регенерації, заміщенні втрачених структур й функцій організму, органу, тканини. Тканини ксеноорганів вміщують різноманітні активатори регенерації й диференціації: фактор росту фібробластів, фактор росту нервів, фактор, що стимулює ріст макрофагальних й еритроїдних колоній, а також антипроліферативні цитокіни, що запобігають клітинній та системній гіперстимуляції. Препарати плаценти у вигляді екстракту і суспензії містять низку мінеральних органічних речовин, вищих жирних кислот (пальмітинова, стеаринова, олеїнова), вітаміни групи В, амінокислоти, кетостероїди, ацетилхолін. Узагальнені результати чисельних робіт, що присвячені з'ясуванню біохімічного складу подібних препаратів, демонструють перспективність їх застосування при широкому спектрі патологій, зокрема, імунологічних. На думку певних дослідників, одна з основних ролей у біологічній активності, наприклад, консервованих тканин, належить органічним карбоновим кислотам представленим

у вигляді суміші кислот в їх природному співвідношенні. Вважається, що лікувальний ефект тканинної терапії відбувається за рахунок специфічної дії присутніх в тканинних препаратах рибонуклеїнових кислот, травматинової амінокислоти, а також азотовмісних речовин, вуглеводів, ліпідів. Ембріональні тканини ксеноорганів не імуногенні, оскільки на ранніх етапах гестації на них не експресовані молекули гістосумісності I й II класів. Експериментальні та клінічні дослідження, засвідчують, що застосування тканинних препаратів призводить до підвищення резистентності організму не тільки до одного певного патологічного чинника, а й до низки несприятливих дій. Так, було з'ясовано [95, 96], що застосування біологічних препаратів призводить до активізації адаптаційних можливостей та імунологічної реактивності. Як за профілактичного, так і за терапевтичного застосування вони полегшують перебіг та запобігають хронізації запальних процесів інфекційної й іншої природи, знижують інтенсивність розвитку дегенеративних процесів й ендокринних розладів. Завдяки своєму впливу на процеси обміну, резистентність організму та низку показників, що є важливими характеристиками для тваринництва (приріст живої маси, відтворювальні здібності й продуктивність, резистентність тощо) широкого застосування ці препарати набули у ветеринарній практиці [97].

Серед природних біологічних препаратів широкого використання в терапії дефектів системи імунітету набули препарати крові, селезінки, нейропептиди тощо.

Лейкоцитарна маса та діалізований лейкоцитарний екстракт (ДЛЕ) – володіє сильною медіаторною дією та використовується як замісна терапія при імунодефіцитних станах за фагоцитарною системою, а також у разі гострих та хронічних інфекційних захворювань з тяжким перебігом. Проявляє активність за рахунок широкого спектру біомолекул у своєму складі: тирозин, серотонін, гістамін, брадикінін, простагландини, нікотинамід, аскорбат, гіпоксантин та низка низькомолекулярних пептидів загальною кількістю більше 200 компонентів [98, 99].

Стовбурові клітини (аутологічні, кістковомозкові, отримані із крові) – здатні відновлювати функції органів і тканин за рахунок диференціації в зрілі клітини.

Плазма крові нативна – містить альбумін, альфа-1- та альфа-2-глобулін, бета- та гамма-глобулін, а також може вміщувати цитокіни, АВО-антигени, розчинні рецептори. Застосовується при імунодефіцитних станах різної природи.

Набули розповсюдження в практиці офіційно зареєстровані природні препарати тимічного походження («Тималін», «Тактивін», «Тимоптін»), які вміщують пептиди, що були екстраговані з вилючкової залози тварин та синтетичні аналоги тимічних гормонів («Тимостимулін») та їх фрагментів («Імунофан», «Бестим») [100]. Ці препарати стимулюють диференціацію окремих субпопуляцій Т-лімфоцитів. При цьому відбувається нормалізація відносного числа $CD4^+$ та $CD8^+$, підвищення здатності Т-клітин до проліферації під впливом мітогенів й збільшення продукції ними відповідних цитокінів. Зазначені ефекти спричиняють посилення функціональної активності нейтрофілів, моноцитів, макрофагів і NK-клітин. У Імунофану також, поряд із іншими властивостями, виявлено здатність до стимуляції *in vitro* синтезу IgA, IgM, IgG. Оскільки більшість імуномодуляторних ефектів тимічних пептидів обумовлено саме непрямою дією на Т-лімфоцити, виникають труднощі у прогнозуванні ефектів на інші клітини. Показанням для використання препаратів цієї групи є інфекційні та інші синдроми, що асоційовані з імунологічною недостатністю, лімфопенія, зниження абсолютного числа Т-лімфоцитів, диспропорція $CD4^+$ та $CD8^+$ лімфоцитів, зниження проліферативної відповіді на мітогени, депресія реакцій ГУТ тощо.

Препарати кістковомозкового походження, в першу чергу, представлені «Мієлопідом» – препаратом комплексу пептидів з надосадової рідини культури кістковомозкових клітин свиней. Виділено декілька пептидів, що здійснюють стимуляцію протипухлинного імунітету, фагоцитозу, антитілоутворюючих клітин, клітин гранулоцитарного ряду та макрофагів, регуляторів диференціювання стовбурових клітин. Мієлопід використовується в лікуванні затяжних та хронічних інфекційних захворювань бактеріальної природи, оскільки посилює

синтез антитіл у присутності антигенів. До синтетичних препаратів кістковомозкового походження відноситься «Сераміл» та «Бівален» [100, 101]. Відомий також «Берлопентин», що є комплексом пептидів кісткового мозку й здійснює ефекти посилення диференціації клітин системи імунітету в умовах імунодефіциту.

Також розробляється низка лікувальних та профілактичних засобів, отриманих із органів імунної системи та інших паренхіматозних органів.

«Біостім» – офіційно не зареєстрований тканинний препарат з паренхіматозних органів свиней на ізотонічному розчині хлориду натрію. У ветеринарній практиці використовується з метою нормалізації показників гемограми, активізації білкового обміну, посилення фагоцитарної активності лейкоцитів крові [97]. «Біостім» сприяє значному підвищенню показників природної резистентності, а саме лізоцимної, бактерицидної та комплементарної активності сироватки крові, сприяє посиленню фагоцитарної активності лейкоцитів, активізації Т-СРОК – лімфоцитів, В-ЕАС – лімфоцитів [96].

«Тембостім» – офіційно не зареєстрований препарат, що виготовлено на основі ембріональних тканин кроля. Так, в експериментах на білих мишах доведено його нешкідливість та низьку токсичність. Під його впливом виявлено підвищення фагоцитарної активності нейтрофілів, підвищення кількості еритроцитів, гемоглобіну, рівня загального білку, γ -глобулінів. Показано також активізацію білкового обміну за показниками вмісту загального білку, γ -глобулінів, підвищення активності ферментів переамінування – АЛТ, АСТ [102].

Біонормалізатор із плаценти людини – офіційно не зареєстрована субстанція, що вміщує широкий комплекс біологічно активних ліпідів, вітамінів А, Е, В₂ та мікроелементів, чинить виражену імуностимулюючу дію. У експериментах з репродукції, показував збільшення альбумінової та α -глобулінової фракцій з одночасним зниженням вмісту γ -глобулінів, імуноглобулінів і загального білка у ветеринарній практиці. Дана субстанція активізує взаємозв'язок жирового і вуглеводного обмінів, що відзначалося тенденцією збільшення рівня холестеролу і фосфоліпідів й зниженням глюкози

[103]. Препарат підвищує індекс завершеності фагоцитозу, відсоток НСТ-позитивних нейтрофілів крові мишей в спонтанному та стимульованому НСТ-тесті. Також підвищує бактерицидну, лізоцимну активність сироватки і вміст комплементу. Застосування ліпофільної фракції субстанції щурам в дозі 5 мкг/кг сприяє підтримці інтенсивності процесів ПОЛ на нижчому фізіологічному рівні, що виражається в зниженні вмісту в крові МДА та ДК. Підвищує показники системи антиоксидантного захисту організму, що виражається в збільшенні активності каталази, глутатіонредуктази і глутатіонпероксидази. Продемонстровано також виражену протизапальну його дію: пригнічення експериментального карагенінового, формалінового та зимозанового запалення. Доведено його здатність до форсифікації ранозагоювальних процесів [104].

«Актовегін» – зареєстрований лікарський засіб фармакологічної групи – різні біогенні препарати, що є депротейнізованим гемодериватом (екстрактом) із крові телят. Ефективний як в лікувальному, так і в профілактичному застосуванні. Активує клітинний метаболізм шляхом збільшення транспорту й накопичення глюкози й кисню, посилюючи його внутрішньоклітинну утилізацію, що призводить до прискорення метаболізму аденозинтрифосфорної кислоти (АТФ). Широко використовується при порушеннях кровообігу у тканинах, ангіопатіях, виразкових, опікових, променевих ураженнях шкіри, травматичних ушкодженнях очей. Антигіпоксична дія даного препарату доповнюється його антиоксидантними ефектами [105–108].

«Ербісол» – зареєстрований лікарський засіб фармакологічної групи – імуностимулятори, що є комплексом природних небілкових низькомолекулярних органічних сполук, отриманий з ембріональної тканини тварин. Містить глікопептиди, пептиди, нуклеотиди, амінокислоти. «Ербісол» знайшов застосування в гастроентерології під час лікуванні гепатитів вірусного та медикаментозного генезу, гепатопатій, гепатозів, цирозу печінки, виразкової хвороби шлунка, неспецифічного виразкового коліту. Гепатопротекторні ефекти «Ербісолу» є чинними і за необхідності активізації детоксикаційної функції печінки [109]. Препарат є ефективним в лікуванні алергічних та аутоімунних

захворювань, зокрема, бронхіальній астмі, атопічному дерматиті та ринокон'юнктивіті. Завдяки вираженим адаптогенним властивостям і здатності підвищувати компенсаторні й захисні функції організму, «Ербісол» застосовують у комплексному лікуванні осіб, які постраждали від радіаційного впливу та екологічного забруднення. Показаний ефект даного препарату при лікуванні травматичних ушкоджень шкіри та кісток, трофічних виразок різної етіології, діабетичних ангіопатій.

Відзначають ефективність «Ербісолу» у профілактиці метастазування. При хіміо- та радіотерапії його застосовують в комплексі як препарат супроводу, у якості гепато-, імунопротектору та репаранту. В реабілітаційний і міжкурсові періоди – також як імунокоректор, для активізації протипухлинного захисту організму [110].

Показано, що імуномодуляторний ефект «Ербісолу» реалізується через макрофагальну ланку, НК-клітини ($CD3^{-}16^{+}56^{+}$) та Т-кілери ($CD3^{+}16^{+}56^{+}$). Також даний препарат чинить імунокоригуючу дію і за умов порушень імунного статусу сприяє його нормалізації внаслідок активації Т-лімфоцитів, Th1-хелперів і Т-кілерів та інгібування активності Th2-хелперів та В-лімфоцитів, що сприяє відновленню балансу між клітинним та гуморальним імунітетом при онкозахворюваннях. Залежно від імунного статусу організму препарат коригує активність і деяких інших факторів гуморального та клітинного імунітету: індукує синтез α -, β - та γ -інтерферонів, фактора некрозу пухлини, інтерлейкіну-2 (ІЛ-2) та ІЛ-12, пригнічує синтез ІЛ-4 та ІЛ-10 [111]. Широкого застосування «Ербісол» набув в лікуванні хронічних інфекцій, зокрема, вірусної та бактеріальної етіології [112–115].

Низка робіт вітчизняних авторів присвячена здатності субстанцій на основі ембріонів курей здійснювати суттєву біологічну дію на імунну систему тварин за різних імунопатологічних станах.

У біотехнології та медицині курячий ембріон застосовують в якості джерела для виробництва біологічно-активних препаратів та косметичних засобів, як ростові середовища для культивування тканин [115]. Подібний інтерес

обумовлений широким комплексом біологічно активних речовин, що входять до його складу, які формуються безпосередньо в процесі розвитку ембріона [116, 117].

Так в роботі Сизова О.О. приділялась увага вивченню складу й фізико-хімічних властивостей цільного ембріонального екстракту зі строком розвитку ембріонів курей з 4-ої до 7-ої доби. Вивчення складу екстракту з ембріонів курей першої третини ембріонального строку розвитку показало, що екстракт представляє собою складну суміш білків, нуклеїнових кислот, ліпополісахаридів. Були ідентифіковані макроглобуліни, гемоглобін, оксигемоглобін, альбумін й білки альбумінового ряду, фетальні білки, низка ростових факторів. З'ясовано, що вміст білків, і зокрема, гемоглобіну в екстрактах значно підвищується починаючи з 7-ої доби розвитку ембріону. Нуклеїнові кислоти ембріонального екстракту представлені фрагментами ДНК та широким спектром РНК. В ембріональних екстрактах, починаючи зі строку розвитку 6 діб, виявляються білки цитокінового ряду. Зокрема, IL-1 та TNF- α в значній концентрації (50 – 60 нг/мл). Відомо, що IL-1 відіграє ключову роль у становленні гуморального й клітинно-опосередкованого імунітету, гемопоезі. Як показали дослідження, цитокіни, що були виявлені у курей, мають високий ступінь гомології з IL-1 β й TNF- α людини [118]. У іншій роботі представлено дані щодо динаміки мінерального складу та вмісту альфа-фетопротейну (АФП) у курячих ембріонів різного строку розвитку. Встановлено, що АФП в курячому ембріоні присутній з 5-ої по 20-ту добу розвитку, його вміст не постійний, а динаміка має хвилеподібний характер. На 9-ту добу відзначено мінімальний вміст АФП, що складав – $1,12 \pm 0,02$ МО/мл [117].

Під час дослідження біологічних властивостей цільного екстракту з ембріонів курей зі строком розвитку до 4-ої доби включно, встановлено, що він не здійснює помітного впливу на імунну систему у піддослідних тварин. Екстракт з ембріонів зі строком розвитку 6 діб має як стимулюючий вплив на антитілогенез, так і демонструє високу фагоцитоз-стимулюючу активність, що проявляється в дозі 0,1 мг/кг. Активація антитілогенезу у разі застосування екстракту з ембріонів

курей з 6-ти добовим строком розвитку супроводжується посиленням синтезу білка. Збільшення фракції β 2-глобулінів поряд з підвищенням вмісту β 1- та γ -глобулінів, може свідчити про активацію моноцитарно-макрофагальної системи. Підвищення рівня альбумінів крові вказує на вплив ембріональних екстрактів на білок-синтетичну та транспортну функції печінки.

Особливий інтерес представляють дослідження впливу біологічно активних речовин ембріонального походження на імунну систему в умовах імунодепресії різноманітної етіології. Показано, що введення екстракту з 6-ти добових ембріонів курей сприяє відновленню імунореактивності імунодепресованих рентгенівським випромінюванням піддослідних тварин за показником гемолізину. Стимуляторний вплив екстракту на гуморальну імунну відповідь проявляється також в умовах Т-клітинного імунодефіциту, що був викликаний попереднім введенням гідрокортизону. Встановлено, що введення ембріонального екстракту сприяє відновленню пригніченого імунітету при введенні його в дозі 0,1 мг/кг. Таким чином, встановлено, що екстракти ембріональних тканин курей кінця першого триместру розвитку володіють вираженою біологічною дією на макроорганізм [118].

В роботі ветеринарного спрямування показано також, що тканинний препарат на основі курячих ембріонів «Біо-ТЕК», що вводиться в дозі 10 мл/гол підшкірно, чинить найбільш фізіологічну дію на гематологічні, фізіолого-біохімічні показники і неспецифічну резистентність організму великої рогатої худоби. Введення тканинного препарату у вказаній дозі коровам за 60 – 55 днів до пологів сприяє підвищенню: кількості лейкоцитів – на 28,7 %, вмісту гемоглобіну – на 9,2 %, альбуміну – на 6,4 %, α -глобулінів – на 21,4 %, загальних ліпідів – на 15,6 %; холестерину – на 6,1 %, глюкози – на 6,9 %; сприяє активізації показників клітинного і гуморального імунітету, підвищує бактерицидну активність сироватки крові – на 15,7 %, фагоцитарний індекс нейтрофілів – на 5,8 %, фагоцитарну місткість – на 31,8 %, фагоцитарне число – на 4,8 %. Дворазове ж застосування тканинного препарату за 55 – 60 днів до пологів і через 30 днів після першого введення в дозі 10 мл/гол. При підшкірному введенні сприяє підвищенню

після отелення: інтегральних показників стану білкового, ліпідного та вуглеводного обмінів порівняно з контролем, а також призводив до підвищення в післяпологовому періоді: фагоцитарного числа – на 16,7 %, фагоцитарного індексу – на 7,4 %, фагоцитарної місткості – на 20,7 % порівняно з тваринами контрольної групи [118].

Китайські науковці проводили дослідження *in vitro* впливу різних концентрацій (10 – 500 мг/мл) білкових та ліпідних фракцій екстракту курячих ембріонів 12-ти діб розвитку на проліферативну і ІЛ-2 синтезуючу здатність лімфоцитів селезінки, а також інтенсивність продукції макрофагами NO у імуносупресованих мишей [18, 22].

Перші спостереження лікувального ефекту екстракту з курячих ембріонів раннього строку розвитку належать канадському лікареві Д.Р. Девідсону, який в 1943 році на Третій Міжнародній Онкологічній конференції доповів результати своєї роботи з його успішного застосування у онкологічних хворих. В подальшому також канадський лікар та вчений Д. Бейн продемонстрував позитивні ефекти застосування подібної субстанції в лікуванні психічних захворювань та розладів опосередкованих рецепторами глутамату та нейрокініну 2. Автори підкреслюють переважання використання ембріонального матеріалу із 7 – 9-ти добовим строком інкубації від запліднення (що відповідає стадії ініціації ангіогенезу), віддаючи перевагу саме курячим ембріонам, хоча можливе їх застосування й від інших птахів. Подібний вибір обумовлений доступністю та простотою виробничих та технологічних аспектів утримання та інкубації. На 9-ту добу відбувається ініціація ангіогенезу, а приріст маси до десятої доби складає 7,5 % від моменту запліднення, після 10-ої доби інтенсивність приросту маси значно підвищується. Потенціал нутрієнтів, що відповідає даній стадії розвитку визначається як високий. Від стадії бластодерми до протеоембріональної стадії ембріонального розвитку ідентифікується низка олігопептидів з молекулярною масою 0,5 – 1 кДа, що вміщують від 2 до 20 амінокислотних залишків. Крім того у цей період, до 11-ої доби ембріонального розвитку, реєструється найбільша експресія ростових

факторів та інших біоактивних пептидів, саме тому автори визначають цей період розвитку як «переломний» і найбільш адекватний для використання [119–126].

Розвиток курячого ембріону вказаного періоду характеризується переходом від островкового кровотворення до кровотворення в печінці та селезінці [123, 124]. В цей період серед еритробластів з'являються клітини, що дають початок серії тромбоцитів та гранулоцитів. Відбувається закладка бурси. Закладка лімфоїдної тканини ж відбувається пізніше. Лімфоцити починають з'являтися в селезінці на багато пізніше – на 15-ту добу. В даний період ще не спостерігається функціонування кісткового мозку [125]. Тимус також формується вже на 10-ту – 15-ту добу ембріонального розвитку.

За рахунок приналежності ембріону вказаного строку розвитку до етапу раннього ембріогенезу, якому ще не притаманна експресія генів головного комплексу гістосумісності клітинні компоненти, що отримуються з даного ембріону є слабо видоспецифічними [126]. МНС курей має назву *B-locus* та є організованим в два незалежних регіони — В та Y. Продукти першого регіону експресуються в основному на еритроцитах, тромбоцитах, лімфоцитах та їх попередниках в тимусі й фабрициєвій сумці, де їх функція ще достовірно невідома. Продукти другого локусу не експресуються на еритроцитах. Вони регулюють розпізнавальну функцію НК-клітин [127].

З 8-ої – 9-ої доби у курячого ембріону починається передплодовий період розвитку, який триває до 12-ої доби. Цей період завершується формуванням раннього плоду [128].

Також, з огляду на те, що відбувається інтенсивна диференціація епітеліальних клітин зачатку тимусу, які на 10 – 11-ту добу диференціюються в лімфоцити, що, ймовірно, призводить до більшої експресії генів *B-locus* (генів головного комплексу гістосумісності курей) [124], ми вибрали матеріал, що відповідає строкам пізньозародкового – ранньоплодового етапу розвитку.

Також, значний внесок у вибір цих строків ембріонального розвитку, внесли дані, щодо активної участі FGF у морфогенезі, на ранньому етапі ембріонального розвитку. Відомо, що з етапів формування первинної смужки вже реєструється

експресія FGF. На 5-ту добу розвитку 9 членів родини FGF експресуються в багатьох анатомічних сайтах: мозку, серці, тулубі, нирках і кінцівках, де вони безпосередньо виконують функції клітинних мітогенів, стимуляторів диференціації, здійснюють хемотаксичні ефекти, виступаючи у ролі ключових регуляторів раннього ембріонального органогенезу. Зв'язування FGF з його рецептором є тригером активації шляхів трансдукції сигналів, таких як Ras/ERK шляху (пов'язаний з проліферацією і диференціюванням), шлях Akt (пов'язаний з виживанням клітин) або протеїнкінази C (PKC) шляхів (залучених до клітинного морфогенезу та міграції) [129, 130].

Низкою авторів доведено антиоксидантні властивості екстрактів із ембріонів курей, зокрема, в умовах імунодепресії різного генезу [131–135].

До переваг застосування препаратів ксеноорганів окрім їх біологічної цінності можна безперечно віднести відсутність суперечливості у принципах біоетики, чим відрізняються питання використання тканинних фетальних препаратів [136].

Серед вітчизняних розробок на особливу увагу заслуговують роботи, в яких курячі ембріони раннього періоду розвитку слугують джерелом біомолекул для конструювання протипухлинних вакцинних препаратів.

Так, в роботах вітчизняних онкологів білки, що були отримані із курячих ембріонів 7-ми діб розвитку, використовуються як пухлинні антигени. А саме, курячі ембріональні білки у складі протипухлинних вакцинних препаратів використовуються як ксеногенні аналоги пухлино асоційованих антигенів, що має на меті подолання імунологічної толерантності до власних пухлино асоційованих антигенів. Дана розробка заснована на еволюційній консервативності молекулярних структур пухлоноасоційованих антигенів та факторів канцерогенезу, що відображається в міжвидовій гомології цих молекул. Отже, з одного боку, на думку авторів, заснований на гомології ембріональних білків, у складі протипухлинної вакцини та власне пухлино асоційованих антигенів пухлини вакцинальний ефект буде потенціюватися саме за рахунок все ж таки присутніх незначних міжвидових структурних відмінностях цих молекул у

людини та курячого ембріону. Авторами підкреслюється, що ксеногенні пухлино асоційовані антигени здатні залучати до боротьби з онкологією природній імунітет, а структурні їх відмінності від людських пухлинних аналогів робить їх високо імуногенними та здатними індукувати специфічні протипухлинні реакції не тільки на ранніх, але і на пізніх стадіях перебігу онкологічного захворювання, коли організм хворого знаходиться під імуносупресивних впливом пухлини та власної імунної системи. Тому вважається, що ксеногенні пухлиноасоційовані антигени можуть стати більш ефективними в профілактиці рецидивів та метастазуванні, а також в генерації процесів руйнування вже сформованих пухлин. Авторами показано експериментально сприяння протипухлинному ефекту за показником гальмування росту сингенної меланоми В-16 шляхом ксеновакцинації, що супроводжувалось відсутністю впливу на основні гематологічні показники [137]. В подальших роботах цих авторів з конструювання протипухлинних вакцинних препаратів показано можливість використання курячих ембріонів раннього строку розвитку, як джерела білків теплового шоку з молекулярною масою 70 кДа, що розглядаються у якості стимуляторів специфічної протипухлинної відповіді, а також у якості носіїв пухлинних антигенів [138].

Отже, представлені дані про біологічну активність субстанцій на основі ксеноорганів, зокрема екстрактів з ембріонів курей, свідчать про перспективність пошуку нових профілактичних й лікарських засобів з гемо- та імунотропною активністю в серед подібних речовин.

РОЗДІЛ 2

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ

2.1 Характеристика лабораторних тварин

В роботі використовувались самці білих безпородних мишей, середнє значення ваги яких було $21 \pm 2,0$ г (розбіжність не перевищувала допустимі 15 %), вік – 2 місяці.

Також були залучені статевовозрілі мурчаки звичайні, середнє значення ваги тіла яких було 180 – 200 г (розбіжність не перевищувала допустимі 15 %).

Тварини утримувались на стандартному харчуванні за стандартних регламентованих умов у віварії Державної установи «Інститут мікробіології та імунології ім. І.І. Мечникова НАМН України». Тварини отримували повноцінний збалансований раціон й воду у вільний доступ.

Виведення тварин з експерименту здійснювалось шляхом декапітації під хлороформним наркозом. Забір крові у тварин здійснювався з хвостової вени під хлороформним наркозом. Робота з тваринами проводилася згідно з принципами Гельсінської декларації, прийнятою Генеральною асамблеєю Всесвітньої медичної асоціації (1964 – 2000 рр.), згідно з положеннями «Європейської конвенції про захист хребетних тварин, що використовуються для досліджень та інших наукових цілей» [139] і «Загальних етичних принципів експериментів на тваринах», ухвалених Першим Національним конгресом з біоетики (Київ, 2001). Висновок комісії з питань біоетики Державної Установи «Інститут мікробіології та імунології ім. І.І. Мечникова НАМН України» протокол №3 від 18 грудня 2015.

2.2 Схеми експериментів

2.2.1 Приготування екстракту, контроль якості та стандартизація

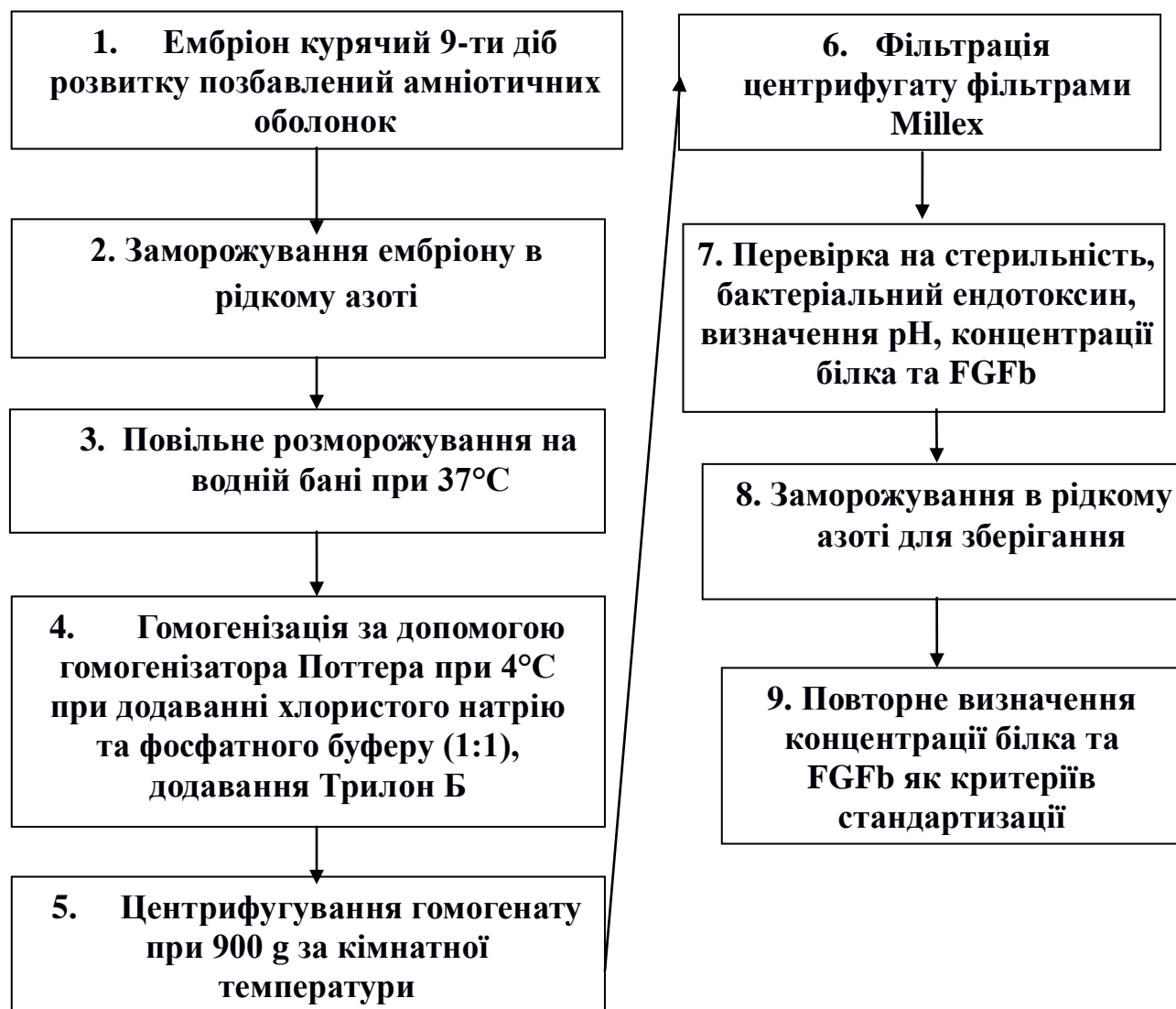


Схема 2.1. Приготування, контроль якості та стандартизація екстракту з ембріональних тканин птахів 9-ти діб розвитку

2.2.2 Визначення деяких конститuentів ЕЕТП 9 та його фракцій



Схема 2.2. Кількісне та якісне дослідження деяких біомолекул в ЕЕТП 9

2.2.3 Порівняння імуномодуляторних властивостей цільного ЕЕТП 9 та його фракцій

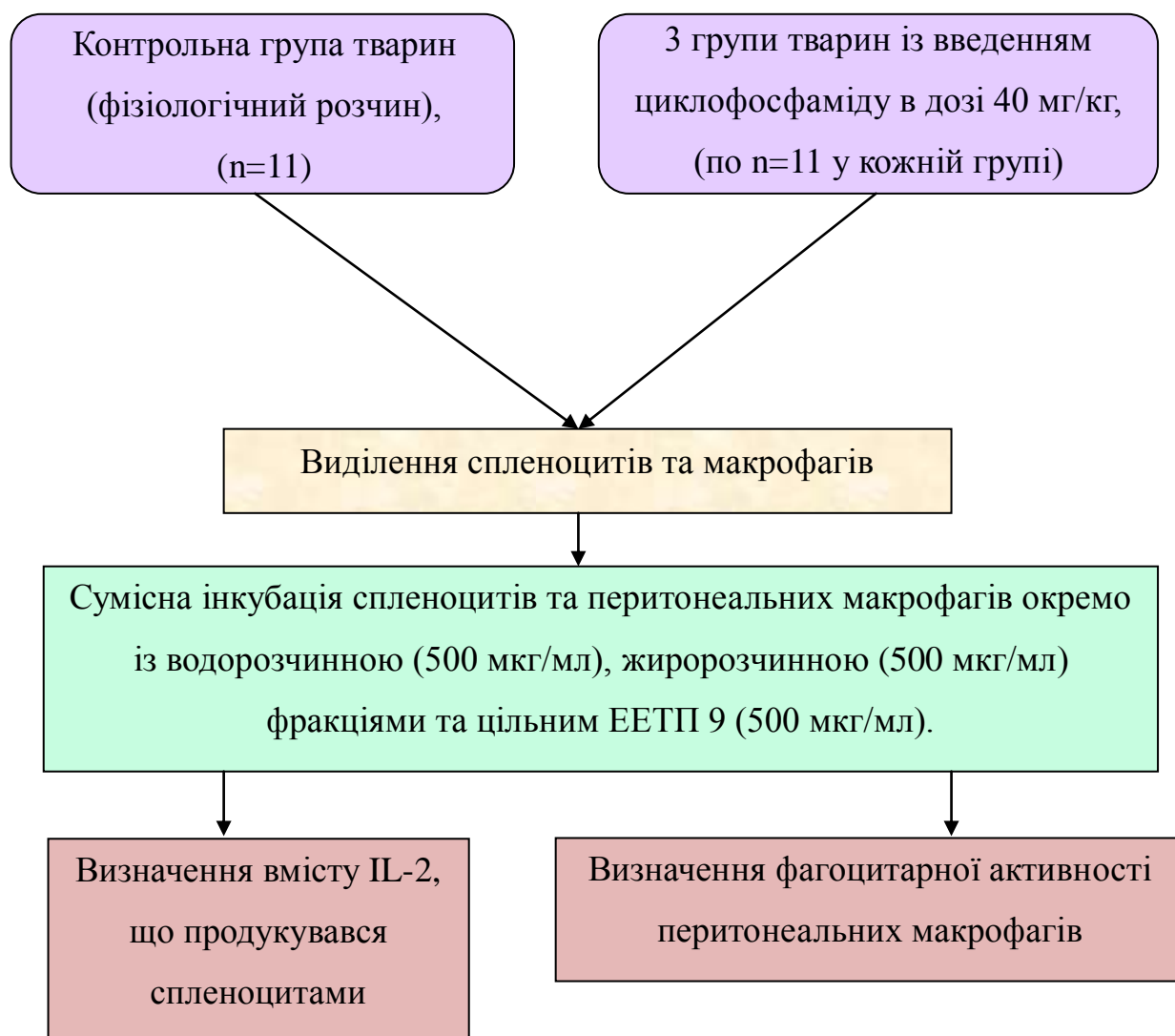


Схема 2.3. Схема експерименту з оцінки впливу цільного ЕЕТП 9 та його окремих фракцій на синтез ІЛ-2 спленоцитами та фагоцитарну активність перитонеальних макрофагів мишей із циклофосфамідною імунодепресією *in vitro*

2.2.4 Визначення алергізуючих властивостей ЕЕТП 9

Дослідження алергізуючих властивостей ЕЕТП 9 проводили шляхом оцінки реакції загальної анафілаксії на мурчаках (кавії звичайні), масою 280 – 300 г, половозрілих, що були розподілені на 4 групи по 11 тварин у кожній. Тваринам

дослідних та контрольної груп проводили серію з 4-х ін'єкцій досліджуваної субстанції (ЕЕТП 9) та еталонного алергену – білку курячого яйця – овальбуміну у тій же концентрації та об'ємі, що був обраний для ЕЕТП 9 (схема 2.4).

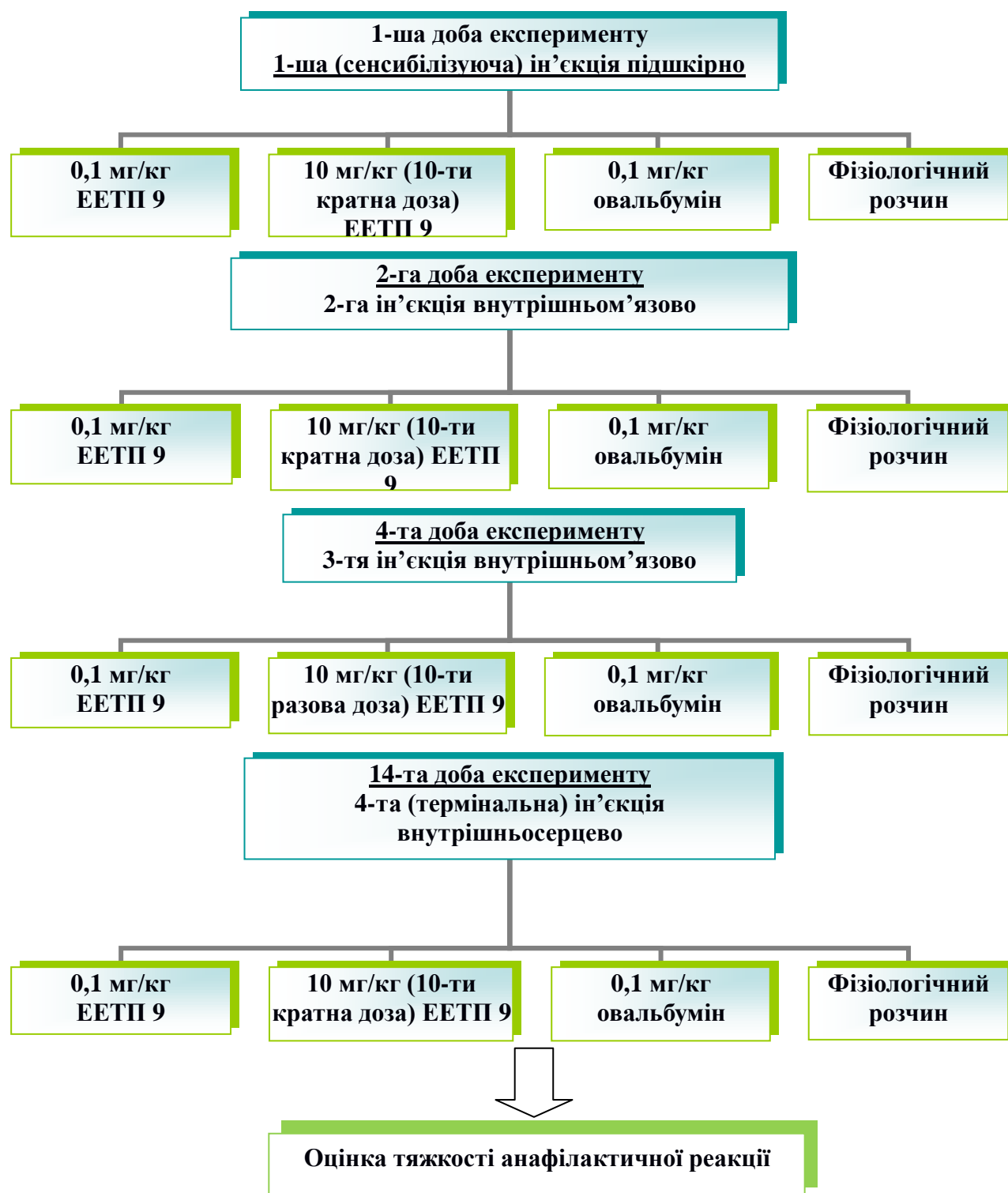


Схема 2.4. Експерименту з дослідження анафілактогенної дії ЕЕТП 9 на мурчаках

2.2.5 Індукція радіаційної імунодепресії в експерименті на мишах та первинна оцінка імуноотропних властивостей ЕЕТП 9

2.2.5.1 Вплив ЕЕТП 9 на 30-ти добову виживаність мишей за умови променевого ураження в діапазоні доз 3 – 9 Гр

Спостереження за виживаністю тварин (14 груп), підданих дії γ -випромінювання в діапазоні доз від 3 до 9 Гр велося впродовж 30-ти діб з розрахунком проценту виживаності.

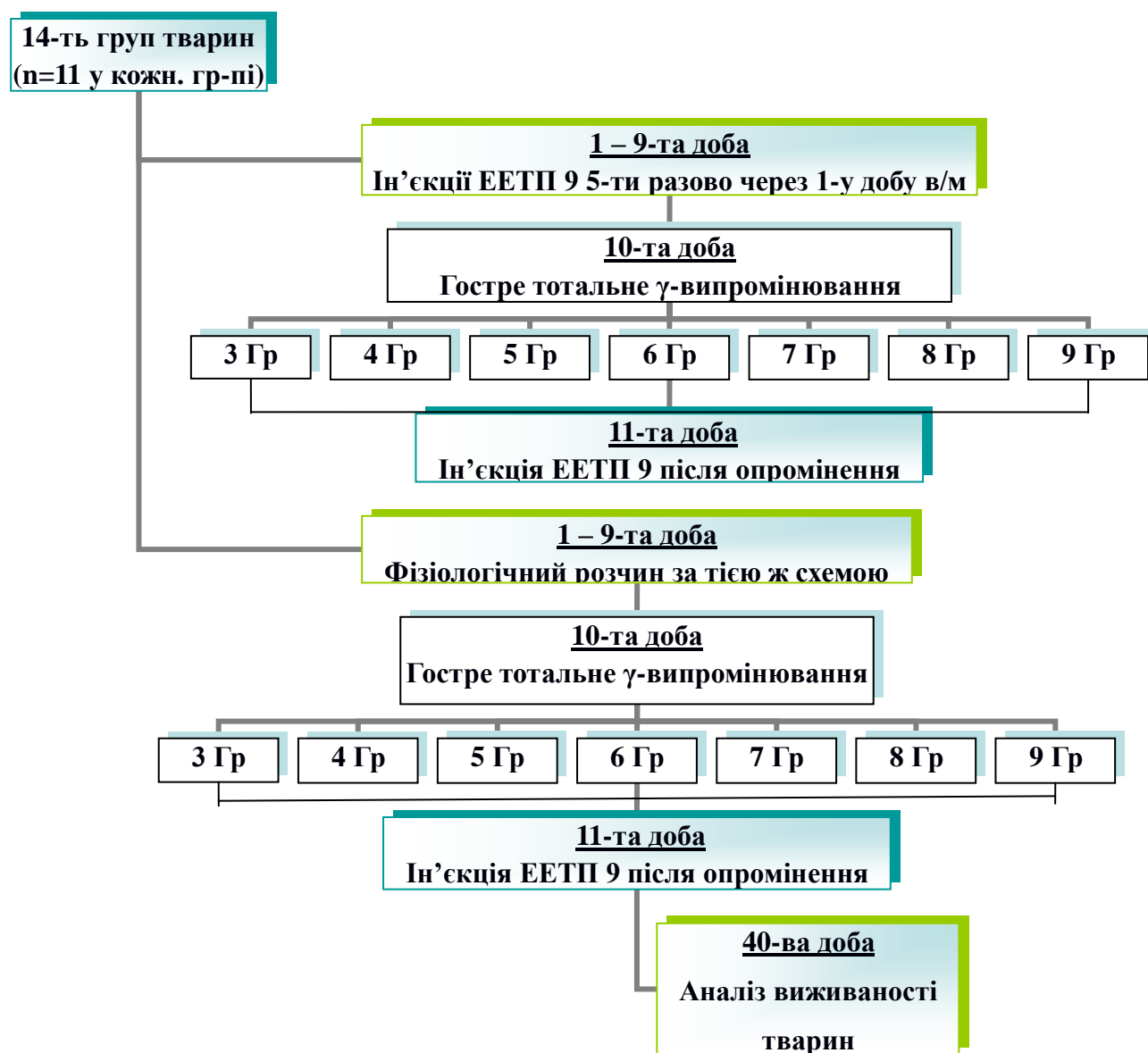


Схема 2.5. Хід експерименту з 30-ти добової виживаності мишей за дії γ -випромінювання в діапазоні доз 3 – 9 Гр

В групі опромінених тварин в летальній дозі (9 Гр) додатково оцінювали середню тривалість життя (схема 2.5).

2.2.5.2 Вплив ЕЕТП 9 на морфологічну структуру органів імунної системи при опроміненні мишей в дозі 5 Гр

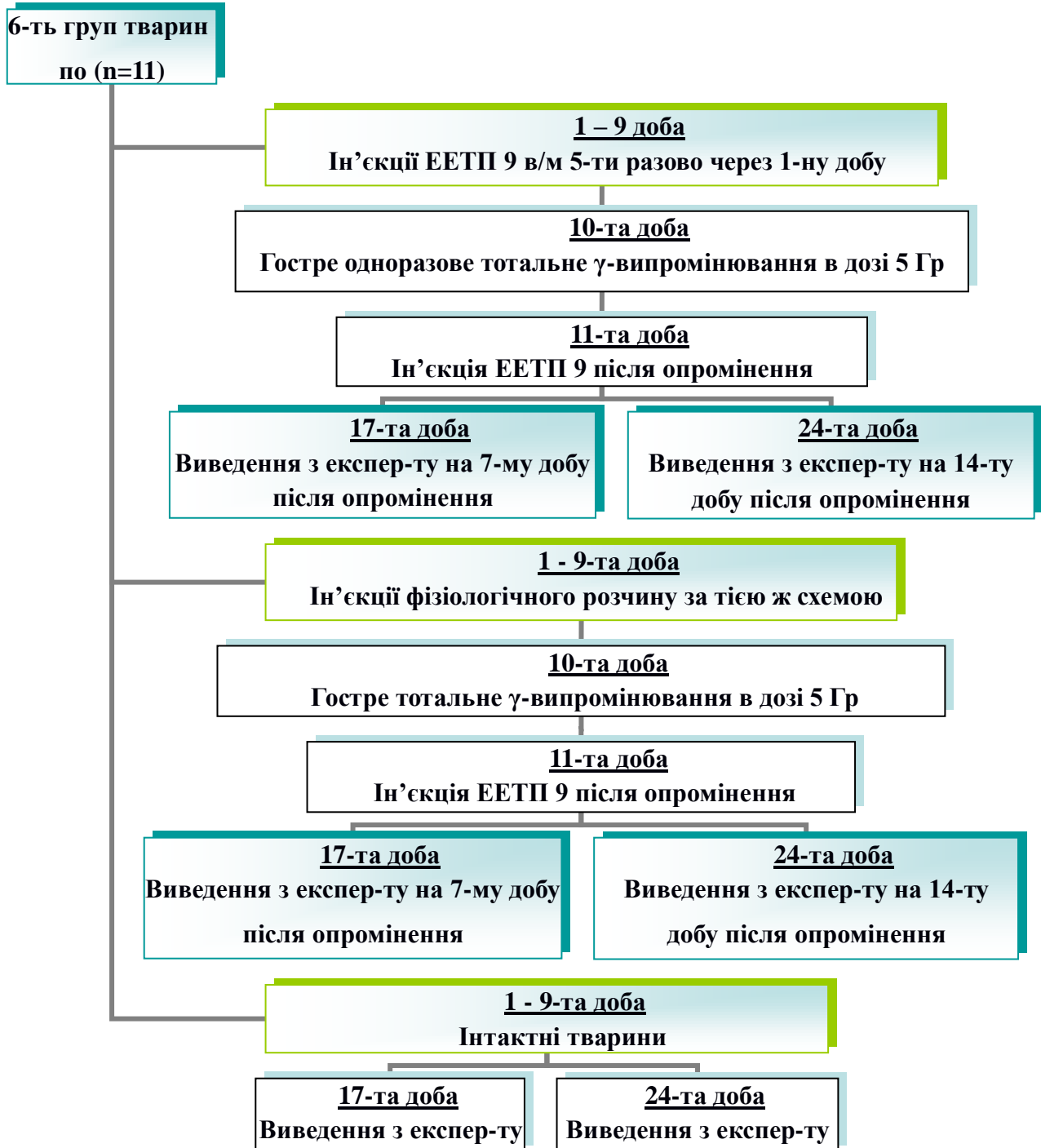


Схема 2.6. Хід експерименту з дослідження впливу ЕЕТП 9 на морфологічну структуру органів імунної системи при опроміненні мишей в дозі 5 Гр

2.2.5.3 Оцінка ефектів ЕЕТП 9 щодо стану гемо-, імунопоезу та імуногенезу за радіаційно-індукованої імунодепресії в експерименті

В серії паралельних експериментів (схема 2.7) на мишах (31 група тварин з урахуванням інтактної) із радіаційною імунодепресією (5 Гр) оцінювали вплив ЕЕТП 9 порівняно з офіційним імуностимулятором препаратом з ембріональних тканин тварин «Ербісол» на наступні показники:

1. Динаміка показників гемограми та відносного числа популяцій лімфоцитів периферичної крові.
2. Динаміка абсолютного числа каріоцитів кісткового мозку, селезінки та тимусу.
3. Динаміка відносного числа sm^+sm^- , sm^+ -клітин та $CD90.2^+$ лімфоцитів у кісткового мозку.
4. Динаміка функціональної активності Т-лімфоцитів у реакції бласттрансформації лімфоцитів з фітогемаглютиніном.
5. Динаміка функціональної активності нейтрофілів периферичної крові: фагоцитарна активність нейтрофілів, НСТ-тест та рівень катіонних білків, вміст лужної фосфатази та мієлопероксидази в нейтрофілах.
6. Динаміка рівня первинних та вторинних продуктів перекисного окиснення ліпідів клітин кісткового мозку.
7. Динаміка концентрації G-CSF, IL-6, Flt3-ligand в супернатанті клітин кісткового мозку, культивованих *in vitro* та IL-1 β , IL-6, IL-4 в сироватці крові.

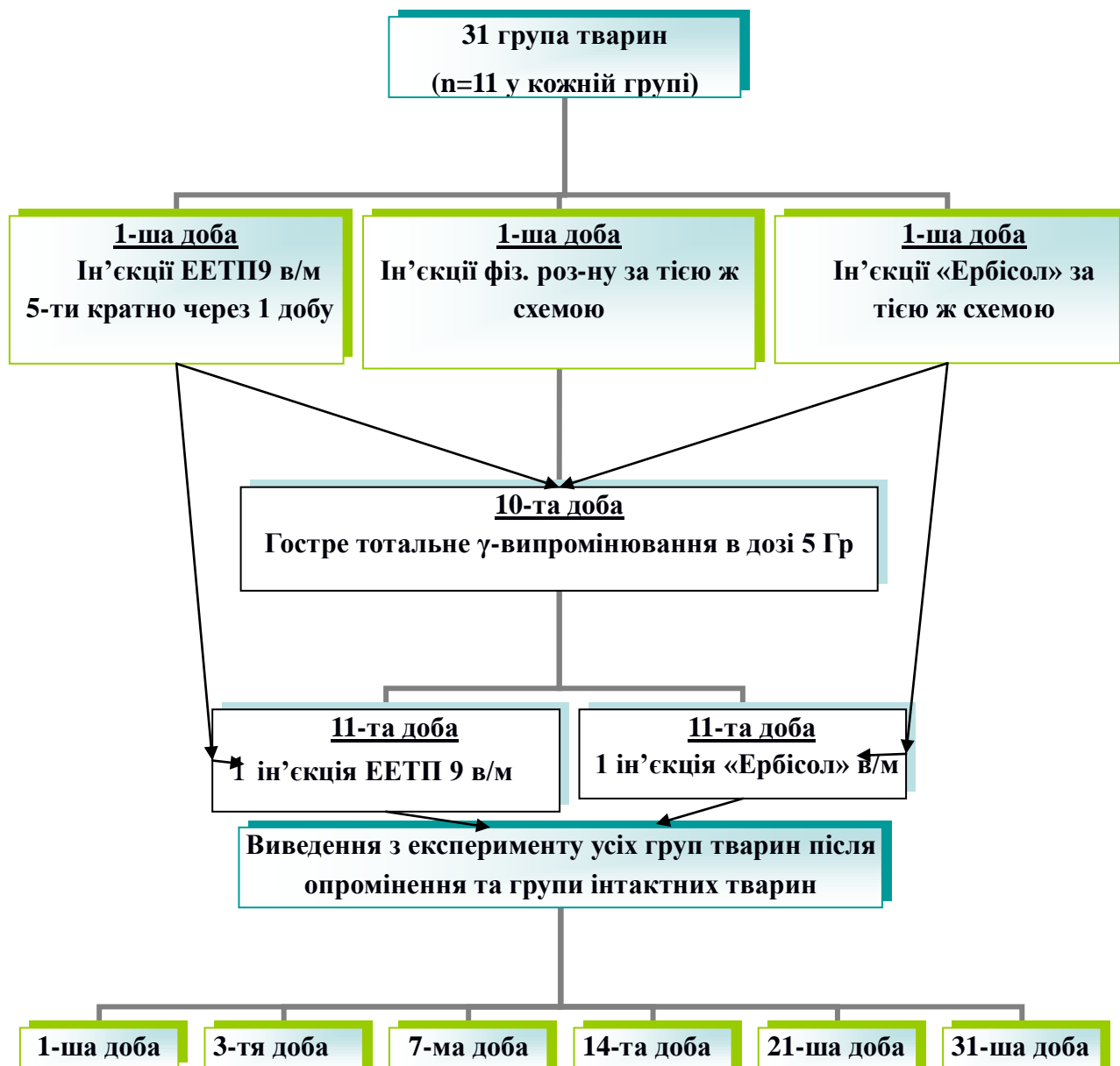


Схема 2.7. Експеримент з дослідження ефектів ЕЕТП 9 на показники стану гемо-, імунопоезу та імуногенезу за індукованої імунодепресії

Вимірювання вказаних цитокінів проводилось за подібною схемою (схема 2.7), однак додатково включали облік результатів в динаміці 1-ої доби після дії γ -випромінювання. Таким чином дослідження проводили на 3-тю, 6-ту, 9-ту, 12-ту годину та 1-шу, 3-тю, 7-му, 14-ту, 21-шу, 31-шу добу.

8. Динаміка титрів специфічних антитіл після імунізації мишей із індукованою імунодепресією протигрипозною вакциною.

Вплив ЕЕТП 9 на рівень специфічного антитілоутворення у мишей із радіаційною імунодепресією оцінювався в експерименті шляхом розрахунку середньгеометричного титру специфічних антитіл після імунізації сезонною протигрипозною вакциною «Inflexal V», (схема 2.8).

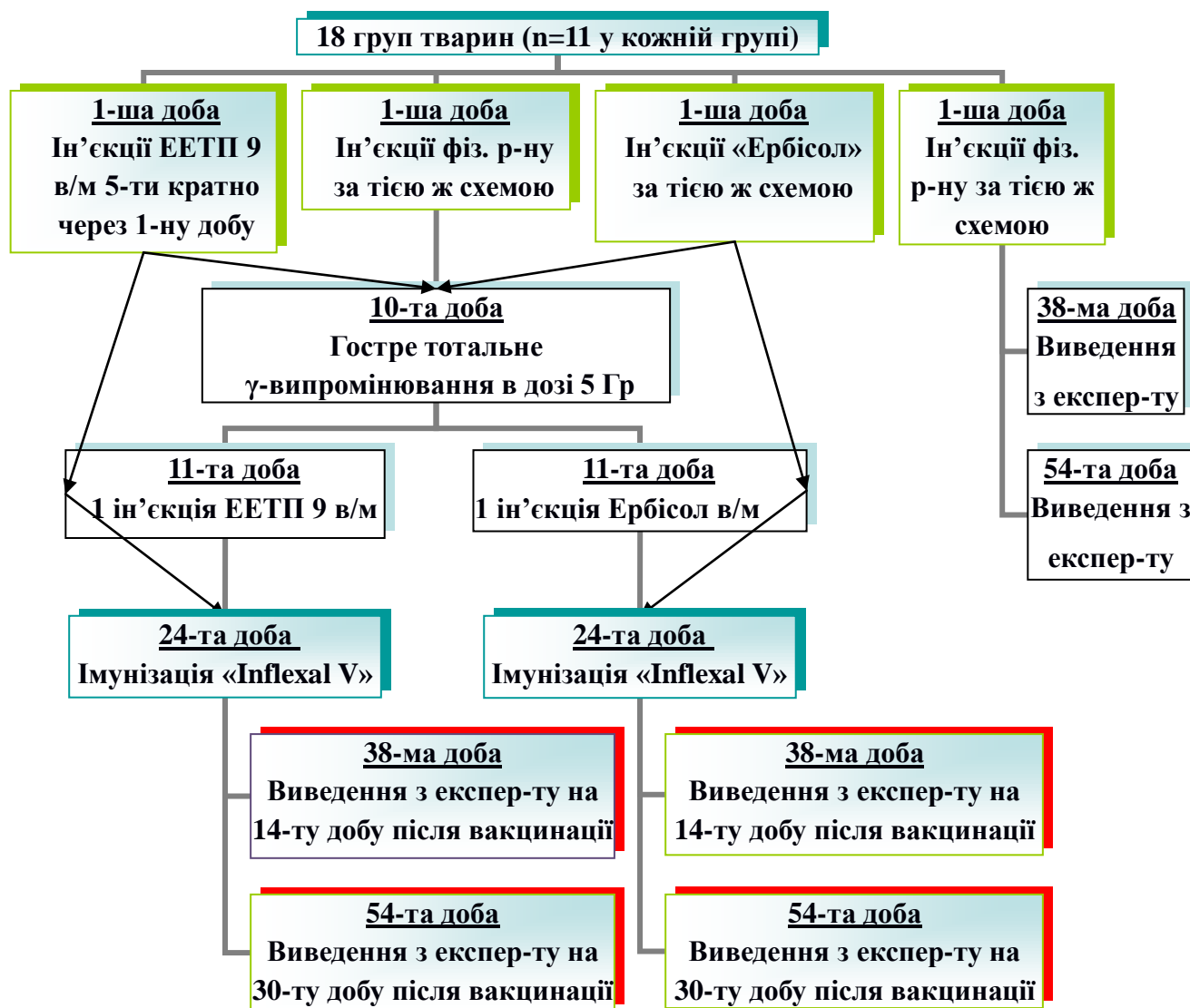


Схема 2.8. Хід експерименту з дослідження впливу ЕЕТП 9 на рівень специфічного антитілоутворення у мишей із радіаційною імунодепресією

2.3 Екстракт з ембріональних тканин птахів 9-ти діб розвитку (ЕЕТП 9) та препарат порівняння

Екстракт з ембріональних тканин курей 9-ти діб розвитку являє собою напівпрозору рожеву рідину для порентерального застосування. Екстракт отримували з заморожених у рідкому азоті (-196° С) ксеноембріонів, а саме курячих ембріонів, що відповідали 9-ій добі розвитку на основі даних овоскопування методом водної екстракції. Отримання екстракту з курячих ембріонів з дослідженням деяких його біологічних властивостей у експерименті на мишах захищено патентом України на корисну модель у 2013 році [140].

В ході отримання екстрактів здійснювалося додавання Трилону Б за для запобігання перебігу окиснювальних процесів в субстанції.

Підбір ефективної дози ЕЕТП 9 здійснювався застосуванням 3-х рекомендованих орієнтовних доз: 1000 мкг, 100 мкг, 10 мкг білка в об'ємі фізіологічного розчину на кг ваги в серії паралельних пілотних експериментів з виживаності після летального бактеріального інфікування [141].

Так, ЕЕТП 9 вводили мишам перед індукцією радіаційної імунодепресії п'ятикратно внутрішньом'язово через добу в дозі 0,1 мг/кг та одноразово після радіаційного впливу.

Препаратом порівняння слугував препарат вітчизняного виробництва «Ербісол», котрий вводили в еквівалентній дозі для тварин після перерахунку рекомендованої добової дози для людей (1 мл на добу), препарат вводили за тією ж схемою, що і ЕЕТП 9.

Препарат «Ербісол» є єдиними природними препаратами українського виробництва, що створені на основі ембріональної тканини тварин (код АТС-класифікації L03A X – Інші імуностимулятори). Згідно з інструкцією до медичного застосування діючими речовинами препарату є комплекс природних небілкових низько-молекулярних органічних сполук негормонального походження, отриманих із тваринної ембріональної тканини та містить

олігопептиди та глікопептиди (загалом 0,07 – 1,00 мг/мл), нуклеотиди, амінокислоти.

Даний препарат, зокрема, виявляє стимуляторні властивості, щодо НК-клітин, Т-лімфоцитів та макрофагів, стимулює синтез α -, β - та γ -інтерферонів, TNF- α , IL-2 та IL-12 та інгібує синтез IL-10. Відзначено, що як препарат супроводу в хіміо- та променевої терапії «Ербісол» діє як імуностимулятор та відновлює протипухлинні властивості імунної системи в якості імунокоректору.

Вибір препарату порівняння серед переліку офіційно зареєстрованих лікарських препаратів базувався на спільності фармакологічних ефектів досліджуваної субстанції – екстракту з ембріональних тканин птахів 9-ти діб розвитку та офіціального препарату – «Ербісол» та спільності джерел отримання цих субстанцій.

2.4 Методи дослідження

2.4.1 Контроль якості ЕЕТП 9

Випробування за для контролю якості проводили відповідно до вимог Державної фармакопеї України [142].

За для контролю якості здійснювали перевірку на:

- стерильність;
- присутність бактеріальних ендотоксинів;
- контроль рН.

З метою запобігання мікробного забруднення перевірка якості зразків проводилася у асептичних умовах ламінарної шафи.

Стерильність. Перевірку на стерильність проводили методом прямого висівання. Для цього використовували по 2,5 мл випробуваної речовини з 10 ампул. При випробуванні на стерильність використовували стерилізоване (121° С, 15 хв) рідке тіогліколеве поживне середовище (рН 7,1) та соєво-казеїнове живильне середовище (рН 7,2) з попереднім контролем ростових властивостей

живильних середовищ тест-штамами, *Clostridium sporogenes* №272, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 (для тіогліколевого середовища), та *Candida albicans* NTCC 885-653, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Aspergillus niger* ATCC 16404 (для соєво-казеїнового середовища) отриманих із Музею мікроорганізмів ДУ «Інститут мікробіології та імунології ім. І.І. Мечникова НАМН України», м. Харків.

Висновок щодо витримування випробуваних зразків випробування на стерильність робили за візуальною відсутністю росту мікроорганізмів після 14-ти добової інкубації.

Бактеріальні ендотоксини. Випробування на бактеріальні ендотоксини проводили гель-тромб методом (граничне випробування) (утворювання щільного гелю в присутності ендотоксинів) із попередньою депірогенізацією лабораторного посуду (250° С, 30 хв). В роботі використовували свіже виготовлені серії розчинів чутливого лізату амебоцитів мечохвоста у воді для ін'єкцій. Досліджувані зразки відповідали вимогам випробування, на основі відсутності гелеутворювання у 2-х паралельних пробах кожного зразка в позитивному результаті у 2-х паралельних пробах позитивних контрольних розчинів та негативному результаті у 2-х паралельних пробах негативних контрольних розчинів.

pH. Вимірювання pH здійснювали за допомогою pH-метра 2696 з електродом HI-1289F (HANNA для рідин) при кімнатній температурі. Прилад відкалібровано при застосуванні свіжеприготованих вільних від діоксиду вуглецю буферних розчинів калію гідрофталату (0,05 М) та розчину натрію тетраборату (0,01 М).

2.4.2 Визначення концентрації білка в ЕЕТП 9

Вимірювання концентрації білка в ЕЕТП 9 здійснювалось ВСА методом (Bicinchoninic Acid Kit for Protein Determination, "Sigma", США). Натрієва сіль біцинхонінової кислоти є стабільною водорозчинною сполукою, що здатна

утворювати інтенсивне фіолетове фарбування за утворення у розчині комплексу з йоном міді (Cu^{2+}) в лужному середовищі. Основою методу є біуретова реакція.

ЕЕТП 9 разводили дистильованою водою до 10 мл. Розчин біцинхонінової кислоти й розчин CuSO_4 перемішували впродовж 5 хв у співвідношенні 50:1 безпосередньо перед додаванням до проб. Для побудови калібрувальної кривої використовували бичачий сироватковий альбумін (Sigma, США) (конц. 20,0 мг/мл), що титрували у співвідношенні 1:2 (кінцевий об'єм 50 мкл). В 96-лунковому планшеті до 50,0 мкл розчинів білків в дистильованій воді та до бланку (дистильована вода) додавали по 200 мкл реактиву й інкубували протягом 30 хв при 37°C . Оптичну густину вимірювали за допомогою спектрофотометру за довжині хвилі 540 нм. Концентрацію білка в пробах визначали за калібрувальною кривою [143, 144].

2.4.3 Визначення вмісту FGFb в ЕЕТП 9

Визначення вмісту FGFb в ЕЕТП 9 здійснювалося за допомогою імуноферментного аналізу згідно з інструкцією до набору «Chicken FGF2/Basic FGF ELISA Kit (Sandwich ELISA)» (96 визначень) фірми «LifeSpan BioSciences» (США). Набір мав наступні характеристики: діапазон вимірюваних величин 15,63 – 1000,00 пг/мл, чутливістю – 6,30 пг/мл, коефіцієнтом варіації результатів 6 визначень bFGF в одному й тому ж зразку з використанням набору не перевищує 10. Вимірювання рівня bFGF в 10 зразках ЕЕТП 9 здійснювалося до та після зберігання в рідкому азоті (кожна проба в дублі).

2.4.4 Фракціонування ЕЕТП 9

До 1 г екстракту додавали 10 мл розчину пепсину (1 г пепсину в 200 мл 0,1 М/л HCl) та нагрівали на водній бані при 37°C протягом 2 год. рН суміщі доводили до 7,5 додаванням 0,1 М/л NaHCO_3 . Далі додавали 10 мл розчину трипсину (1 г трипсину в 200 мл 0,1 М/л NaHCO_3) та нагрівали на водній бані при

37° С протягом 2 год супроводжуючи зтрушуванням. Деактивацію ферментів здійснювали інкубацією на киплячій водній бані протягом 3 хв.

Після ферментативного гідролізу додавали петролейний ефір (х/ч) («Флюгер», Україна) у співвідношенні 1:1 та протягом 4 год перемішували за допомогою магнітної мішалки. Далі суміш переносили в колбу, з'єднану із зворотним холодильником, в якому була проведена додаткова екстракція на водяній бані при 80° С протягом 4 год. Далі проводили центрифугування на високошвидкісний центрифугу протягом 5 хв. Після цього, водорозчинна частина була ліофілізована. Жиророзчинну частину концентрували до постійної маси в умовах зниженого тиску у роторному випарювачі при 50° С за для повного видалення петролейного ефіру. Далі за для отримання жиророзчинної фракції проводили ліофілізування [143].

2.4.5 Дослідження спектру та кількості амінокислот в ЕЕТП 9

Якісне та кількісне визначення амінокислот в зразках ЕЕТП 9 здійснювалося на базі Випробувального центру Інституту тваринництва НААН України, п/в Кулиничі, Харківська обл. Вимір амінокислот проводили за допомогою автоматичного аналізатору амінокислот ААА-339м фірми «Microtechna», (Чехія). Вимірювання амінокислот здійснювалося в триплетах.

Отриману після попереднього ферментативного гідролізу водорозчинну фракцію ЕЕТП 9 в об'ємі 0,5 мл за допомогою насосу вводили в хроматографічну колонку. За для поділу амінокислот застосовували хроматографічну колонку з катіонобмінною смолою зі ступеневим елююванням натрій-цитратними буферними розчинами з рН 3,28; 4,25; 5,28.

За для отримання стандартної амінограми проводили аналіз стандартної суміші амінокислот з молярною концентрацією кожної з них 1 мМ/дм³. З метою отримання стандартного піку аміаку – продукт розпаду амідів в гідролізаті брали відповідну кількість хлориду амонію.

Масову частку амінокислот розраховується за формулою:

$$X = (S_n M \times 50 \times 10^{-3}) / (S_{cm} m),$$

де S_n – площа піку відповідної амінокислоти, що була отримана на амінограмі, см^2 ; M – молекулярна маса амінокислоти, Да; 50 – об'єм розчину, що отримали після гідролізу, см^3 ; 10^{-3} – концентрація амінокислоти в стандартному розчині моль/дм³; S_{cm} – площа піку стандартного розчину амінокислоти, см^2 ; m – маса навіски зразку, г [145].

2.4.6 Дослідження спектру та кількості жирних кислот в ЕЕТП 9

Якісне та кількісне визначення жирних кислот в зразках ЕЕТП 9 здійснювалося на базі Випробувального центру Інституту тваринництва НААН України, п/в Кулиничі, Харківська обл. Вимір жирних кислот здійснювався на газорідинному хроматографі «Хром-5». Вимірювання вказаних молекул здійснювалося в триплетах.

Зразки екстракту об'ємом 0,5 мл попередньо концентрували та екстрагували з них ліпіди за методом Фолча. Для чого зразки двічі обробляли 10-ти кратним об'ємом (5 мл) суміші хлороформу з метанолом у співвідношенні 2:1, далі піддавали високооборотному центрифугуванню за для отримання ефективного розділу фаз. В подальшому промивали екстракт ізотонічним NaCl об'ємом 5 мл, та центрифугували, з метою видалення хлороформної фази. Розчинник видаляли на роторному випарювачі. Отримані жирні кислоти піддавалися переетерифікуванню в метилові ефіри. Дериватизація проводилась наступним чином. До висушеного біологічного матеріалу додавали 150 мкл 0,5 N метоксиду Na в метанолі та нагрівали протягом 3-х хв при температурі 60 – 65 °C. Далі додавали 1,0 мл 10 %-го метанольного розчину трифтористого бору, та нагрівали впродовж 45 хв при температурі 75° C. Після закінчення метилювання в охолоджені віали вносили 1 мл н-гептана та 1 мл H₂O, екстрагували метилові ефіри до вуглеводневої фази. Повне розшарування емульсії отримували за допомогою низькооборотної

центрифуги протягом 0,5 – 1,0 хв. Екстраговані в гептанову фазу метилові ефіри вимірювали на газовому хроматографі [146].

2.4.7 Стандартизація ЕЕТП 9

На підставі проведених досліджень щодо визначення вмісту FGFb та концентрації білку, нами запропоновано встановлення тотожності сировини за цими кількісними показниками та доброякісності сировини по визначенню їх кількості. Стандартизацію ЕЕТП 9 діб розвитку проводили використовуючи 5 серій сировини. Усі досліджувані зразки були отримані з курячих ембріонів 9-ти діб розвитку, що встановлювалося на основі даних овоскопування. Сировину отримували з екологічно чистих районів, що пройшли повний санітарно-ветеринарний контроль.

Таблиця 2.1

Параметри стандартизації ЕЕТП 9, що вимірювалися до та після кровопливу

№	Опис	Мікробіологічна чистота	Загальний білок, мг/мл		bFGF, нг/мл	
			до кровопливу	після кровопливу	до кровопливу	після кровопливу
1	Екстракт із ембріонів курей 9-ти діб розвитку, що є напівпрозорою рожевою речовиною	В 1 мл препарату не виявлено присутності дріжджових та цвільових грибів, бактерій родів <i>Esherichia</i> , <i>Salmonella</i> , <i>Pseudomonas</i> , <i>Staphylococcus</i>	0,77	0,69	123,40	117,10
2	Відповідає	Відповідає	0,77	0,67	121,20	120,80
3	Відповідає	Відповідає	0,81	0,65	118,70	125,10
4	Відповідає	Відповідає	0,83	0,69	116,30	122,40
5	Відповідає	Відповідає	0,76	0,66	122,0	117,0

Середнє значення концентрації білка в складі ЕЕТП 9 до крiовпливу складає $(0,77 \pm 0,05)$ мг/мл, після крiовпливу – $(0,69 \pm 0,03)$ мг/мл. Середнє значення рiвня bFGF в складі ЕЕТП 9 до крiовпливу складає $(120,32 \pm 2,82)$ нг/мл, після – $(120,48 \pm 3,48)$ нг/мл, (табл. 2.1).

2.4.8 Визначення концентрації ІЛ-2, синтезованого спленоцитами мишей із циклофосфамідною імунодепресією під впливом цільного ЕЕТП 9 та його фракцій *in vitro*

З метою порівняння здатності водорозчинної та жиророзчинної фракцій, а також здатності цільного ЕЕТП 9 здійснювати імунотропний вплив *in vitro* визначали концентрацію ІЛ-2 синтезованого спленоцитами мишей. Для цього були сформовані наступні групи:

1 група – контрольна група, миші якої отримували фізіологічний розчин об'ємом 0,25 мл, (n=11),

2 група – миші, яким одноразово внутрішньочеревинно вводили циклофосфамід об'ємом 0,25 мл в дозі 40,00 мг/кг, (n=33).

Селезінку мишей усіх груп видаляли після декапітації тварин під хлороформним наркозом. Орган звільнювали від оточуючої сполучної тканини, суспендували у середовищі RPMI-1640. Ізольовану суспензію спленоцитів було доведено до концентрації 1×10^6 кл/мл збагаченим середовищем RPMI-1640.

Після прекультивації протягом 4 год при 37°C та CO_2 5 % суспензії спленоцитів (100 мкл/лунку) інкубували окремо з білковою (500 мкг/мл), ліпідною фракціями (500 мкг/мл), а також з цільним ЕЕТП 9 (500 мкг/мл) протягом 48 год, після вилучали з кожної лунки 100 мкл надосадової рідини та зберігали при температурі -20°C . Рівні ІЛ-2 оцінювалися за допомогою тест-систем «Mouse IL-2 Quantikine ELISA Kit» («R&D systems», USA) з чутливістю набору: 3,0 пг/мл та діапазоном вимірювання: 15,6 – 1000,0 пг/мл методом імуноферментного аналізу згідно з інструкціями виробника.

2.4.9 Визначення рівня показників фагоцитарної активності перитонеальних макрофагів мишей із циклофосфамідною імунодепресією під впливом цільного ЕЕТП 9 та його фракцій *in vitro*

З метою порівняння здатності водо- та жиророзчинної фракцій, а також здатності цільного ЕЕТП 9 здійснювати імунотропний вплив *in vitro* визначали також рівень фагоцитарного індексу та фагоцитарного числа перитонеальних макрофагів у мишей із циклофосфамідною імунодепресією. Для цього були сформовані наступні групи:

1 група – контрольна група, миші якої отримували фізіологічний розчин об'ємом 0,25 мл, (n=11);

2 група – миші, яким одноразово внутрішньочеревинно вводили циклофосфамід об'ємом 0,25 мл в дозі 40,00 мг/кг, (n=33).

Миші були виведені з експерименту шляхом декапітації із застосуванням хлороформного наркозу. Взяття перитонеального ексудату здійснювали шприцем із попереднім введенням у брюшину середовища № 199 із гепарином. Отриману рідину центрифугували при 600 g протягом 5 хв. Осад клітин ресуспендували в 3 – 5 мл середовища № 199. Кількість макрофагів з відібраного перитонеального ексудату була підрахована в камері Горяєва і доведена середовищем RPMI до 1×10^6 кл/мл. Визначали життєздатність макрофагів в тесті з трипановим синім.

Суспензії перитонеальних макрофагів преінкубували протягом 48 год окремо з білковою (500 мкг/мл), ліпідною фракціями (500 мкг/мл), а також з цільним ЕЕТП 9 (500 мкг/мл). Далі суспензію макрофагів переносили у скляні флакони, що містили скельця та додавали об'єкт фагоцитозу з подальшою інкубацією протягом 2 год при 37° С.

В якості об'єкту фагоцитозу використовували добову культуру *Staphylococcus aureus* 209 P отриману на м'ясо-пептонному агарі. Зазначений штам отримано з Музею мікроорганізмів ДУ «ІМІ НАМН», м. Харків. Суспензію готували з добової культури стафілококу вбитої нагріванням на водній бані протягом 30 хв при 70° С в стерильному фізіологічному розчині (рН 7,2 – 7,4) і

розводили до концентрації бактеріальних клітин 1 млрд/мл по оптичному стандарту мутності № 10 ГІСК ім. Л.А. Тарасевича. Оцінку фагоцитарної активності макрофагів, що адгезовані на склі проводили за методом Л.Б. Хейфеца і В.А. Абалакін (1973). Після інкубації скельця фіксували сумішшю Никифорова і фарбували за методом Романовського-Гімза. Показники фагоцитозу оцінювали методом мікроскопії, підраховуючи кількість фагоцитуючих клітин, що містять в своїй цитоплазмі поглинений об'єкт фагоцитозу – фагоцитарний індекс (на 25 полів), і оцінювали активність адгезії об'єкту фагоцитозу на поверхні макрофагів – фагоцитарне число.

2.4.10 Дослідження алергізуючих властивостей ЕЕТП 9

Дослідження алергізуючих властивостей ЕЕТП 9 проводили шляхом оцінки реакції загальної анафілотоксії на мурчаках (кавіях).

Дослідження проводили на звичайних кавіях-альбіносах, масою 280 – 300 г, обох статей, статевозрілих. Дослідні групи: 1 група – мурчаки, яким вводили досліджувану субстанцію у дозі 0,1 мг/кг, (n=11); 2 група – мурчаки, яким вводили досліджувану субстанцію у дозі, що в 10 разів перевищує обрану дозу, тобто 1 мг/кг, (n=11); 3 група – мурчаки, яким вводили еталонний алерген – 0,6 %-ий розчин овальбуміна, (n=11); 4 група – тварини, яким вводили фізіологічний розчин, що є розчинником ЕЕТП 9, (n=11). Перша ін'єкція проводилась підшкірно, дві наступні – внутрішньом'язово з проміжком в 1 добу в стегно, термінальна ін'єкція – внутрішньосерцево на 14-ту добу після сенсibiliзуючої ін'єкції, сумарно дорівнювала сенсibiliзуючій дозі, вводилась також і контрольній групі. Після введення термінальної дози за мурчаками спостерігали протягом 5 хв. Тяжкість шоку оцінювалась за анафілактичним індексом за Вейглом [147] за наступною формулою:

$$\frac{(N \times 4) + (N1 \times 3) + (N2 \times 2) + (N3 \times 1) + (N4 \times 0)}{N + N1 + N2 + N3 + N4}$$

$$N + N1 + N2 + N3 + N4$$

де N — число загиблих мурчаків; N1 — число мурчаків, у котрих спостерігали розвиток важкого шоку; N2 — число мурчаків, у яких розвився помірний шок; N3 — число мурчаків, у котрих розвився слабкий шок; N4 — число мурчаків, у яких шоку не розвинулося.

Критерії за якими можна охарактеризувати ступінь шоку:

Індекс Weigle складає 1 (+): короткочасне чухання носа, чухання шерсті, зниження температури тіла (не менш, ніж на 1°C).

Індекс Weigle – 2 (++) : чітко виражені часті чухання, одиничне чухання, зниження температури тіла..

Індекс Weigle – 3 (+++) : спастичний кашель, бокове положення тіла тварини, виділення калу й сечі.

Індекс Weigle – 4 (++++): спазм дихальних шляхів, конвульсивні стрибки, судоми. Тварина гине.

2.4.11 Вплив ЕЕТП 9 на показники виживаності мишей, які були піддані дії γ -випромінювання в діапазоні доз 3 – 9 Гр

Оцінка ефектів ЕЕТП 9 здійснювалась шляхом спостереження за 30-ти добовою виживаністю тварин, опромінених в діапазоні доз 3 – 9 Гр, а також підрахунком середньої тривалості життя мишей, що загиблі й спостереженням за динамікою їх загибелі при опроміненні в дозі LD₈₀₋₁₀₀ (9 Гр) [141].

2.4.11.1 30-ти добова виживаність мишей, що були піддані дії γ -випромінювання в діапазоні доз 3 – 9 Гр з метою визначення фактору зміни дози

Фактор зміни дози (ФЗД) демонструє, у скільки разів збільшується значення рівноеквівалентних доз випромінювання за дії препарату. В якості рівноеквівалентних доз порівнювали напівлетальні дози випромінювання LD_{50} , тобто дози, що викликали загибель 50 % тварин. Таким чином, ФЗД розраховували за наступною формулою:

$$\text{ФЗД} = LD_{50} \text{ (із застосуванням профілактичної субстанції)} / LD_{50} \text{ (без її застосування)}$$

За для встановлення величини ФЗД використовували білих безпородних мишей самиць, половозрілих віком 2 місяці. Тварин, котрих розподілили на 14-ть груп (по 11 у кожній). Кожну з 7-ми груп мишей відповідно піддавали дії зовнішнього загального одноразового γ -випромінювання в дозах 3, 4, 5, 6, 7, 8 та 9 Гр на установці РУМ-17 в Державній установі «Інститут медичної радіології С.П. Григор'єва НАМН України», м. Харків. Ще 7 груп мишей також піддавали дії випромінювання відповідно у вказаному діапазоні доз, але застосовували ЕЕТП 9 [141].

2.4.11.2 Оцінка ефективності ЕЕТП 9 за середньою тривалістю життя мишей при їх опроміненні в дозі LD_{80-100} (9 Гр)

Окремо оцінювали зміну тривалості життя мишей, яким на фоні летального опромінення (9 Гр) застосовували ЕЕТП 9. При цьому фіксували мінімальну, максимальну тривалість життя та розраховували їх середню тривалість. Отримані дані порівнювали із даними, що були встановлені у групі мишей, які були опромінені в летальній дозі (9 Гр) без застосування ЕЕТП 9 [141, 148].

2.4.12 Дослідження морфологічної структури органів імунної системи мишей

У подальшу роботу у якості дози зовнішнього тотального γ -випромінювання, що викликає радіаційну імунодепресію у мишей було обрано 5 Гр.

Радіаційну імунодепресію у тварин викликали впливом тотального одноразового зовнішнього γ -випромінювання, яке здійснювалося на установці РУМ-17 в дозі 5 Гр впродовж 12 хвилин 30 секунд при шкірно-фокусній відстані 40 см, силі струму 10 мА, напругою в трубці 180 кВ, фільтр 0,5 Cu + 1Al на базі Державної установи «Інститут медичної радіології ім. С.П. Григор'єва» НАМН України, м. Харків.

З метою отримання даних стосовно структурно-функціональних змін органів імунної системи (тимус, селезінка, кістковий мозок) забір матеріалу здійснювався в мінімальні строки після виведення дослідних та контрольних тварин з експерименту під хлороформним наркозом, фіксація матеріалу проводилася в забуференому формаліні (10 %-ий розчин формальдегіду). Після фіксації препарати відмивалися й піддавалися поступовому зневодненню в серії спиртів зростаючої міцності протягом 1-єї доби. Далі відбувалася обробка сумішшю абсолютного спирту з хлороформом у співвідношенні 1:1, потім ксилолом й заливка розплавленим насиченим розчином парафіну в хлороформі, далі термостатування при 37° С протягом 1-єї доби. Подальша заливка проводилася в термостаті при температурі 54 – 56° С в трьох порціях парафіну. Завершальна заливка здійснювалася в парафін з додаванням воску з подальшим отриманням парафінових блоків. Зрізи товщиною 5 – 10 мкм з парафінових блоків проводилися на мікротомі. Фарбування зрізів після обробки ксилолом проводилося розчином гематоксиліну й еозином з подальшим зневодненням та заключенням зрізу. Гістологічний аналіз проводився з використанням світлового мікроскопа Primo Star з оптикою Carl Zeiss, об'єктив план-ахроматичної корекції Plan-Achromat: 40x/0,65, окуляр 10x (eyepieces 10 x/18 Vr.foc). Аналізу піддано по 3 зрізи від кожної тварини всіх дослідних та контрольної груп [149].

2.4.13 Визначення загального числа лейкоцитів периферичної крові мишей

20 мкл крові вносили в пробірку з 0,4 мл 5 %-им розчином оцтової кислоти. Вміст пробірки ретельно перемішували й заповнювали їм камеру Горяєва, витримували протягом 1 хв для осідання лейкоцитів. Підрахунок здійснювали при малому збільшенні мікроскопу в затемненому полі зору в 100 великих квадратах. Підраховане число лейкоцитів помножили на 50, а також на 10^6 [150].

2.4.14 Визначення абсолютного числа формених елементів периферичної крові мишей

Абсолютне число формених елементів периферичної крові досліджували в мазках крові, що були фіксовані спиртом й пофарбовані за Романовським-Гімзе. Підрахунок клітин проводили за допомогою світлового мікроскопу Primo Star в тонких ділянках мазків. Визначали абсолютну кількість окремих видів лейкоцитів [150].

2.4.15 Виділення мононуклеарів периферичної крові та визначення відносного числа популяцій лімфоцитів мишей

З метою виділення мононуклеарів гепаринізовану кров (20 ОД гепарину на 1 мл крові) розбавляли фізіологічним розчином з додаванням PBS (phosphate-buffered saline), без вмісту Ca^{2+} та Mg^{2+} («Biochrom GmbH»). Розведену кров об'ємом 1 мл нашаровували на розчин фікол-урографіну («Histopaque-1119») (густиною 1,119 г/мл), («Sigma-Aldrich») у співвідношенні 1:3. Далі проводили центрифугування за кімнатної температури протягом 20 хв на центрифугі ОПн-8 при 4000 об/хв. Після центрифугування збирали кільце з інтерфази фікол/плазма, що вміщує мононуклеари в окрему пробірку. Суспензію мононуклеарів тричі відмивали середовищем RPMI, проводячи центрифугування між відмиваннями протягом 5 хв при 300 g. Мононуклеари ресуспендували в 1 мл ізотонічного PBS

доводячи концентрацію клітин до 2×10^6 клітин/мл. Підрахунок клітин здійснювали в камері Горяєва.

В подальшу роботу брали суспензії клітин з рівнем життєздатності 95 %.

Життєздатність клітин оцінювали за допомогою тесту з 0,2 %-им розчином трипанового синього в ізотонічному розчині Хенкса без глюкози, котрий додавали до суспензії виділених клітин до камери Горяєва у співвідношенні 1:1. В камері Горяєва здійснювали підрахунок загиблих (блакитний колір) та живих клітин (непофарбовані). Процент життєздатних клітин (N) розраховували за наступною формулою:

$$N = (1 - \text{число пофарбованих клітин} / \text{загальне число клітин}) \times 100 \%,$$

[149, 150].

До отриманих мононуклеарів крові об'ємом 25 мкл (3×10^6 клітин/мл) додавали 10 мкл розчину інактивованої кролячої сироватки та ресуспендували. Далі проводили інкубацію при 20°C протягом 20 хв. В пробірки вносили 20 мкл відповідних мАТ в робочій концентрації та після ресуспензування інкубували в присутності 0,1 NaN_3 протягом 30 хв при 4°C . Клітини відмивали PBS забуференим фізіологічним розчином із центрифугуванням при 400g протягом 5 хв з наступним ресуспензуванням в 10 мкл козячої сироватки. Після інкубації клітин при 4°C протягом 5 хв вносили в пробірку мАТ мічені відповідною флуоресцентною міткою та інкубували протягом 30 хв при 4°C . Після чого відмивали клітини та центрифугували при 400 g протягом 5 хв. Далі в пробірки вносили по 20 мкл 30 %-го гліцерину, перемішували та переносили клітини в лунки предметного скла.

В роботі використовували анти-мишачі моноклональні антитіла до відповідних антигенів (CD3^+ , CD4^+ , CD8^+ та $\text{CD45R}^+/\text{B220}$) та ізотипічні контролі фірми «Biolegend», (USA). Клітини відмивали, фіксували 1 %-им параформальдегідом. Облік результатів з підрахунком 200 клітин із флуоресцентною міткою (зелене світіння) здійснювали за допомогою мікроскопу

Primo Star iLED з люмінесцентним блоком. Таким чином визначали відносне число CD3⁺, CD4⁺, CD8⁺ та CD45R⁺/B220⁺-лімфоцитів.

2.4.16 Визначення абсолютного числа каріоцитів кісткового мозку мишей

За для дослідження числа мієлокаріоцитів кісткового мозку виділяли стегнові кістки тварин усіх дослідних груп. Мієлокаріоцити кісткового мозку були виділені зі стегнових кісток шляхом вимивання 5 мМ ethylenediaminetetraacetic acid–phosphate buffered saline (PBS), рН 7,4, що вміщував 0,5 %-ий альбумін телячої сироватки. Після центрифугування (400 g, 10 хв, 4° С), 0,02 мл суспензії розміщували у пробірку з 4 мл 3 %-го розчину оцтової кислоти (розведення в 200 разів). Через 2 хв після заповнення камери Горяєва (після осідання формених елементів) ядровмісні клітини були підраховані в 100 великих квадратах за допомогою світлового мікроскопу Primo Star. Розрахунок проводився за формулою:

$$X = (n \times 200 \times 250) / 100,$$

де X – число мієлокаріоцитів в 1 мкл клітинної суспензії, n – число мієлокаріоцитів в 100 великих квадратах, 200 – розведення суспензії клітин кісткового мозку, 250 – коефіцієнт для переведення в 1 мкл (об'єм одного великого квадрату 1/250 мкл), 100 – число великих квадратів камери Горяєва [149].

2.4.17 Визначення відносного числа sm^+sm^- та sm^+ клітин у лімфоїдному пулі кісткового мозку мишей

З клітинної суспензії кісткового мозку виділяли лімфоцити у градієнті щільності 1,090 фікол-верографін [151]. Суспензію виділених з клітин кісткового мозку лімфоцитів (2×10^7 клітин/мл) вносили по 0,25 мл у пробірки і центрифугували при 1500 об/хв на центрифугі ОПн-8 впродовж 5 хв.

а) Далі готували мазки на склі, яке попередньо обробляли бичачим сироватковим альбуміном (БСА). Потім мазки вкривали анти- μ -ФІТЦ міченою сироваткою («Sigma-Aldrich») та проводили інкубацію протягом 30 хв у вологій камері за кімнатної температури. У відмитих та виготовлених препаратах досліджували 300 клітин, що вміщують флуоресцентну мітку, за допомогою мікроскопу Primo Star iLED з люмінесцентним блоком. За цих умов відбувалося мічення лише поверхневого μ -ланцюга імуноглобулінового рецептору (живі зрілі $s\mu^+$ клітини).

б) За умови фіксації мазків суспензії лімфоцитів у 5 %-ій льодяній оцтовій кислоті у абсолютному етанолі на льоду впродовж 12 хв перед обробкою анти- μ -ФІТЦ міченою сироваткою («Sigma-Aldrich») відбувалося мічення як цитоплазматичного, так і поверхневого μ -ланцюга. Від отриманого числа клітин з міченими обома (цитоплазматичним та поверхневим) μ -ланцюгами віднімали процент $s\mu^+$ -клітин (отриманий у пункті а). Таким чином розраховували процент клітин, які вміщували лише цитоплазматичний μ -ланцюг ($s\mu^+s\mu^-$) [152, 153].

2.4.18 Визначення відносного числа зрілих Т-лімфоцитів CD90.2⁺ (Thy 1.2) мишей

Для визначення числа зрілих Т-лімфоцитів користувалися МАТ до CD90.2⁺ (Thy 1.2) - «Alexa Fluor® 647 anti-mouse CD90.2⁺ Antibody» фірми «BioLegend», (USA) за допомогою імунофлуоресцентної мікроскопії. Перед проведенням постановки реакції імунофлуоресценції для зменшення неспецифічного зв'язування клітин, що несуть Fc-рецептори проводили преінкубацію клітин з анти-мишачими CD16⁺/CD32⁺. Тричі відмитий у фосфатно-сольовому буфері осад мікроскопіювали за допомогою мікроскопу Primo Star iLED з люмінесцентним блоком, підраховуючи кількість мічених лімфоцитів серед 300 клітин [149].

2.4.19 Визначення абсолютного числа каріоцитів тимусу мишей

Тимус мишей усіх дослідних та контрольних груп видаляли після декапітації тварин під хлороформним наркозом. Тимус звільнювали від оточуючої сполучної тканини. Далі готували клітинну суспензію, для чого проводили гомогенізацію органу у середовищі RPMI-1640. Після фільтрації клітинною суспензією заповнювали камеру Горяєва, де підраховували загальне число ядерних клітин у за допомогою світлового мікроскопу Primo Star. Розрахунки проводились аналогічно пункту 2.4.10 [152].

2.4.20 Визначення абсолютного числа каріоцитів селезінки мишей

Селезінку мишей усіх дослідних та контрольних груп видаляли після декапітації тварин під хлороформним наркозом. Орган звільнювали від оточуючої сполучної тканини, суспендували у середовищі RPMI-1640. Загальне число клітин органу визначали у камері Горяєва за допомогою світлового мікроскопу Primo Star. Розрахунки проводились аналогічно пункту 2.4.10 [154].

2.4.21 Визначення вмісту цитокінів в супернатанті каріоцитів кісткового мозку, культивованих *in vitro*, у мишей

Матеріалом для визначення концентрації цитокінів слугував супернатант каріоцитів кісткового мозку мишей усіх дослідних груп. Для цього дослідних тварин виводили з експерименту декапітацією під хлороформним наркозом. Вилучали стегнові й великі гомілкові кістки, звільнювали їх від м'яких тканин. Епіфізи отриманих кісток відокремлювали. Діафізи стегнових і великих гомілкових кісток промивали середовищем DMEM, що містить 15 %-ий розчин фетальної сироватки великої рогатої худоби, 100 од/мл пеніциліну, 100 мкг/мл стрептоміцину, 12 мМ L-глутаміну. Мононуклеари, виділяли з вимитого кісткового мозку центрифугуванням у 5 мл культурального середовища впродовж

10 хв при 400g на градієнті щільності Lymphoprep (Sigma, $\rho = 1,077 \text{ г/см}^3$). Надосадову рідину видаляли. Осад з кожної пробірки ресуспендували в ростовому середовищі до концентрації 1×10^6 кл/мл. Культивували протягом 24 год при температурі 37°C й $5\% \text{ CO}_2$ в 96-лункових планшетах в кількості 2×10^5 на лунку в середовищі RPMI 1640 з додаванням 10% -го розчину ембріональної телячої сироватки й 80 мкг/мл гентаміцину [150]. Досліджували спонтанну цитокінову продукцію в супернатантах, що були отримані після культивування мононуклеарів кісткового мозку в триплетах. Вказані цитокіни визначали методом імуноферментного аналізу на приладі «Stat-Fax 303+», (USA) згідно з інструкцією до діагностичних наборів. В роботі використовували тест-набори для імуноферментного аналізу: «Quantikine Mouse Flt3-ligand ELISA» виробництва фірми «R&D systems», (USA) з чутливістю набору: $5,0 \text{ пг/мл}$ та діапазоном вимірювання: $31,2 - 2000,0 \text{ пг/мл}$; «Quantikine Mouse G-CSF ELISA Kit» фірми «Invitrogen Thermo Scientific», (Austria) з чутливістю набору: $0,5 \text{ пг/мл}$ та діапазоном вимірювання: $0,5 - 150,0 \text{ пг/мл}$; «Mouse G-CSF ELISA Kit» фірми «MyBioSource», (USA) з чутливістю набору: $4,0 \text{ пг/мл}$ та діапазоном вимірювання: $31,2 - 2000,0 \text{ пг/мл}$; «Mouse IL-6 Mouse ELISA» фірми «Avicera bioscience, Inc.», (USA) з чутливістю набору: $2,0 \text{ пг/мл}$ та діапазоном вимірювання: $4,0 - 500,0 \text{ пг/мл}$ та «Mouse IL-6 Platinum ELISA» (96 визначень) фірми «eBioscience», (Austria), що характеризувався чутливістю – $6,5 \text{ пг/мл}$ та діапазоном вимірювання: $31,3 - 2000,0 \text{ пг/мл}$.

2.4.22 Визначення вмісту цитокінів в сироватці крові мишей

З метою визначення рівнів сироваткових цитокінів IL-1 β , IL-6, IL-4 у тварин здійснювали забір крові з хвостової вени під хлороформним наркозом на 3-тю, 6-ту, 9-ту, 12-ту, 24-ту годину, на 3-тю, 7-му, 14-ту, 21-шу та 31-шу добу після дії γ -випромінювання.

Вказані цитокіни визначали методом імуноферментного аналізу на приладі «Stat-Fax 303+», (USA) згідно з інструкцією до діагностичних наборів.

Для визначення рівнів ІЛ-1 β в сироватках крові використовували набір набір «Mouse ІЛ-1 β /ІЛ-1 beta ELISA Kit» («LifeSpan BioScience», USA), що характеризується чутливістю – 0,49 пг/мл та діапазоном вимірювання: 1,37 – 1000,00 пг/мл.

Для визначення рівнів ІЛ-6 в сироватках крові використовували набір «Mouse ІЛ-6 Platinum ELISA» фірми «eBioscience», (Austria), що характеризувався чутливістю – 6,50 пг/мл та діапазоном вимірювання: 31,30 – 2000,00 пг/мл та «Mouse ІЛ-6 High Sensitivity ELISA Kit», «eBioscience», що характеризувався чутливістю – 0,21 пг/мл та наступним діапазоном вимірювання: 1,56 – 100,00 пг/мл. Для визначення рівнів ІЛ-4 в сироватках крові використовували набір «Mouse ІЛ-4 Platinum ELISA», «eBioscience», (Austria), що характеризувався чутливістю – 2,0 пг/мл, діапазоном вимірювання: 3,90 – 250,00 пг/мл та «Mouse ІЛ-4 High Sensitivity ELISA Kit», «eBioscience», (Austria), що характеризувався чутливістю – 0,32 пг/мл та наступним діапазоном вимірювання: 0,63 – 40,00 пг/мл.

2.4.23 Визначення показників фагоцитарної активності нейтрофілів периферичної крові мишей

Кров отриману від мишей розміщували у пробірку з антикоагулянтом гепарином (10 од/мл). Кров, що отримали центрифугували впродовж 5 хв при 1,5 тис об/хв. Відбирали зваж лейкоцитів. До зважу лейкоцитів додавали об'єкт фагоцитозу у співвідношенні 1:50, потім інкубували в термостаті при температурі 37⁰ С протягом 30 хв при постійному помішуванні. Далі робили мазок на склі, фіксували фіксатором Май-Грюнвальда й фарбували за Романовським-Гімзе. Підрахунок фагоцитарного індексу (%) й фагоцитарного числа (ум.од.) вели під імерсійним збільшенням світлового мікроскопу Primo Star. В якості об'єкту фагоцитозу використовували стандартизовану суспензію латексу (10 %-на полістирольна суспензія) діаметром 1,5 мкм «ДиаэМ» (РФ) [155].

2.4.24 Визначення відновлення нитросинього тетразолію нейтрофілами периферичної крові (НСТ-тест) мишей

На предметне скло наносили 50 мкл досліджуваної клітинної суспензії, 50 мкл розчину гепарину – 10 од/мл, 50 мкл зависі латексу (50000 часточок/мкл) і 50 мкл 0,1 %-го розчину нитросинього тетразолію, приготованого на ізотонічному розчині хлориду натрію. У контролі замість латексу додавали 5 мл середовища 199.

Всі компоненти реакції ретельно перемішували і залишали у вологій камері на 20 хв в термостаті при 37° С. Після цього препарат залишали при кімнатній температурі до повного висихання.

Фіксували 10 хв в етанолі й за для фарбування обробляли 20 хв 2 %-им розчином метилового зеленого. Результати реакції враховували за допомогою імерсійного об'єктиву $\times 90$ на світловому мікроскопі Primo Star. Враховували не менше 100 нейтрофілів. Враховували відсоток клітин, що формують гранули формазану, і кількість утворених гранул за цитологічним індексом [156].

2.4.25 Визначення вмісту катіонних білків у нейтрофілах периферичної крові мишей

Вміст катіонних білків в гранулах нейтрофілів периферичної крові визначали за методом Пігаревського (1981) в модифікації, що заснований на взаємодії аніонного фарбника зеленого стійкого (FCF) з катіонними білками паличкоядерних нейтрофілів за рН 8,1 [157].

За для цього висушені на повітрі мазки крові фіксували в суміші 1-єї частини формаліну та 19-ти частин 96 %-го етанолу протягом 20 секунд. Фіксовані мазки занурювали у забуферений спиртовий розчин стійкого зеленого з рН 8,1. Пофарбовані таким чином мазки одразу промивали дистильованою водою та потім занурювали до 0,25 %-го водного розчину азуру А на 20 секунд. Мазки промивали дистильованою водою та висушували у повітрі.

При цьому лізосоми гранулоцитів фарбуються в яскраво-зелений колір, а клітинні ядра – бузковий колір.

Забуферений спиртовий розчин стійкого зеленого готували наступним чином: 0,2 М розчину трис (24,2 г сухого трис розчинювали в 1 л дистильованої води); 25 мл 0,2 М розчину трис змішували з 22,5 мл 0,1 Н НСІ й 52,5 мл метанолу, отримуючи метиловий-трис буфер; 100 мг сухого стійкого зеленого розчинювали в 100 мл метанолового трис-буферу. Корекцію рН здійснювали через 24 години після додавання в розчин порошку сухого трис.

Водний розчин азуру А готувався наступним чином: розчинювали 250 мг сухого азуру А в 100 мл дистильованої води.

В мазках за допомогою світлового мікроскопу підраховували 100 гранулоцитів. Внутрішньоклітинний вміст катіонних білків оцінювали напівкількісно за формулою :

$$СЦК = 3a+2b+1,5v+1z+0,5d+0e/100,$$

де а – е – число подібних клітин з певним ступенем пофарбованості цитоплазми стійким зеленим; цифри відображають вираженість та інтенсивність фарбування: 0 – відсутність фарбування цитоплазми й ліпосомальних гранул, 0,5 – присутність в цитоплазмі одиничних пофарбованих гранул, 1 – половина цитоплазми заповнено світло-пофарбованими гранулами, 1,5 – цитоплазма рівномірно заповнена гранулами, пофарбованими в світло-зелений колір (зустрічаються одиночні темно-зелені гранули), 2 – цитоплазма вміщує 1/3 темно-зелених гранул, 3 – цитоплазма вміщує 2/3 темно-зелених гранул [157].

2.4.26 Визначення активності лужної фосфатази нейтрофілів периферичної крові мишей

У інкубаційній суміші лужна фосфатаза призводить до ферментативного розщеплення нафтилфосфату до α -нафтолу та двозаміщеного фосфорнокислого

натрію (первинна реакція). Потім α -нафтол зв'язується з міцним синім В утворюючи азобарвник (вторинна реакція).

Мазки крові висушували за кімнатної температури та фіксували в парах 40 %-го розчину формаліну впродовж 3 – 4 хв.

На фіксовані формаліном мазки наносили рівномірним шаром інкубаційну суміш, що складалася зі змішаних та відфільтрованих розчинів 1 та 2.

Розчин 1: 2,5 мг α -нафтилфосфату натрію розчиняють в невеликій кількості боратного буфера, а потім поступово додають іншу частину боратного буфера, загальний об'єм – 2,5 мл.

Розчин 2: 5 мг нейтрального міцного синього розчиняють в 2,5 мл боратному буфері, змішуючи їх поступово, (рН = 9,18).

До складу буферної суміші входили (розчин А): 0,025 М тетраборат натрію ($\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \times$), для цього 0,953 г тетраборату натрію розчинювали в дистильованій воді в мірній колбі об'ємом 100 мл; (розчин Б) - 0,1 М HCl . До 50 мл розчину А - тетраборату натрію додавали розчин Б: 5 мл. Доводили рН суміші до 9,18 – 9,19.

Усі маніпуляції проводились із дотриманням температурного режиму (18 – 20 °С) за для збереження активності ферменту. Після інкубації мазки промивали під проточною водою впродовж 10 хв, потім – дистильованою водою і висушували.

Надалі за для візуального диференціювання нейтрофільних гранулоцитів від інших клітин крові ядра клітин забарвлювали впродовж 0,5 – 1 хв 0,5 %-им розчином нейтрального червоного.

Мікроскопію мазків проводили із використанням імерсійної системи ($\times 90$) за допомогою світлового мікроскопу Primo Star. Активність лужної фосфатази визначали за кількістю гранул коричневого кольору в цитоплазмі нейтрофілів, ядра яких були пофарбовані в червоний колір [157].

2.4.27 Визначення активності мієлопероксидази нейтрофілів периферичної крові мишей

З метою визначення активності мієлопероксидази застосовували метод бензидинової реакції заснований на окисненні бензидину пероксид-пероксидазною системою до нестабільного бензидинового синього, котрий перетворюється на стабільний бензидин коричневий.

Висушені при кімнатній температурі мазки крові фіксували в ексикаторі з попередньо сублімованими парами 40 %-го розчину формаліну 96 %-им етанолом впродовж 3 – 4 хв.

Після фіксації мазки крові промивали дистильованою водою, висушували при кімнатній температурі та інкубували без доступу світла впродовж 3 хв. Для цього на фіксовані мазки рівномірним шаром наносили послідовно 2 інкубаційні суміші. Мазки з 1-ою інкубаційною сумішшю (1 г мідного купоросу розчинений у воді доводили до 100 мл буферною сумішшю: 50 мл 0,1 М розчину трису ($C_4H_{11}NO_3$) та 44,7 мл 0,1 М розчину HCl з доведенням дистильованою водою до 100 мл) витримували впродовж 1 хв, а після промивання дистильованою водою, наносили 2-гу інкубаційну суміш (10 мг основного бензидину розчиняють в 1,5 мл 96 %-го розчину етанолу, додають 10 мл дистильованої води невеликими порціями. Потім в розчин вносять 13,5 мл буферної суміші, і 2-3 краплі 1 %-го розчину перекису водню. Отриманий розчин фільтрують через скляний фільтр) - на 2 хв. Потім мазки промивали в дистильованій воді та висушували при кімнатній температурі.

Надалі для диференціювання нейтрофільних гранулоцитів від інших клітин крові їх фарбували 0,5 %-им розчином нейтрального червоного впродовж 1 хв.

Мікроскопію проводили під імерсією ($\times 90$) за допомогою світлового мікроскопу Primo Star. Активність мієлопероксидази визначали за кількістю гранул синьо-коричневого кольору в цитоплазмі нейтрофілів, ядра котрих пофарбовані в червоний колір [157].

2.4.28 Дослідження функціонального стану Т-лімфоцитів в реакції бласттрансформації лімфоцитів мишей

З метою визначення функціональної активності лімфоцитів селезінки використовували загальноприйняту реакцію бласттрансформації лімфоцитів (РБТЛ) на поліклональний Т-клітинний мітоген фітогемаглютинін (ФГА) [158]. З клітинних суспензій селезінки отримували лімфоцити. В стерильних умовах лімфоцити переносили в культуральне «повне» середовище: RPMI-1640; 2,5 % FCS, 0,2 мл L-глутаміну, 10 мл HEPES-buffer, 2-меркаптоетанолу та 50 мкг гентаміцину. Інкубування здійснювали протягом 72 годин в мікроплейтах. До лунок із клітинними суспензіями додавали ФГА в дозі 20 мг/мл (Sigma, USA). Контроль залишали без додавання мітогену. Клітинні суспензії з ФГА інкубували в атмосфері 5 % CO₂ при температурі 37° С. Облік результатів реакції здійснювали на світловому мікроскопі Primo Star. Результати виражали в індексі стимуляції (ІС), що являє собою відношення кількості трансформованих клітин в РБТЛ з ФГА до кількості клітин в РБТЛ без нього.

2.4.29 Дослідження рівня специфічного антитілоутворення у відповідь на імунізацію протигрипозною вакциною мишей

Дослідження функціонального стану В-лімфоцитів проводили шляхом оцінки рівня титрів специфічних антитіл у відповідь на імунізацію протигрипозною вакциною.

Імунізація тварин здійснювалась одноразово внутрішньочеревинно (в/ч) сезонною полівалентною протигрипозною вакциною «Inflexal V», в дозі 0,25 мл.

Вакцина «Inflexal V» являє собою систему, що містить лецитинові віросоми високоочищених поверхневих антигенів (гемаглютинін та нейрамінідаза) вірусів грипу А і В. Імунізація групи мишей із радіаційно-індукованою імунодепресією здійснювалась на 14-ту добу після впливу на них γ -випромінювання (5 Гр). Забір сироваток для визначення специфічних антитіл до 3 антигенних складових

протигрипозної вакцини «Inflexal V» здійснювався на 14-ту та 30-ту добу після вакцинації у тварин всіх груп. Рівень специфічних антитіл до антигенів визначався в реакції гальмування гемаглютинації (РГГА) зі специфічним антигеном. РГГА являє собою метод виявлення противірусних антитіл у сироватці крові, що базується на феномені відсутності аглютинації еритроцитів під дією антигену у присутності імунної до нього сироватки крові.

З метою видалення неспецифічних інгібіторів гемаглютинації, які можуть міститись у досліджуваних сироватках, перед здійсненням аналізу всі зразки оброблялися нейрамінідазою холерних вібріонів, яка, не впливаючи на специфічні антитіла, руйнує інгібітори гемаглютинації до вірусів А і В у сироватках людини і тварин [159].

Після видалення неспецифічних інгібіторів готували двократні розведення сироваток у лунках плексигласового планшету, починаючи з 1:10 до 1:640 і вище в об'ємі 0,2 мл. До кожного розведення сироватки додавали 0,2 мл робочої дози антигену (4 АО). Суміш перемішували у шейкері при кімнатній температурі і залишали при температурі $20 \pm 2^\circ \text{C}$ на 30 хв, потім у кожному лунку додавали 0,4 мл 1 %-ої суспензії курячих еритроцитів. Суміш повторно перемішували у шейкері, залишали при температурі $20 \pm 2^\circ \text{C}$ на 40 – 45 хв (до осідання еритроцитів у контролі), після чого проводили облік результатів реакції. За наявності специфічних антитіл у сироватці спостерігалася затримка аглютинації еритроцитів. За титр сироватки брали граничне розведення, що викликало повну затримку гемаглютинації [158].

Результати представлені у вигляді середнього геометричного титру антитіл з розрахунком коефіцієнту варіації.

2.4.30 Дослідження рівня продуктів перекисного окиснення ліпідів в кістковому мозку мишей

Визначення рівня первинних продуктів перекисного окиснення ліпідів (ПОЛ) базується на властивості гідропероксидів і дієнових кон'югатів поглинати

ультрафіолетове випромінювання з максимумом при довжині хвилі 232 нм. Оптична густина розчину пропорційна концентрації дієнових кон'югатів у зразку. Визначення первинних продуктів ПОЛ – дієнових кон'югатів (ДК), триєнових кон'югатів (ТК) проводили спектрофотометрично.

Визначення концентрації вторинних продуктів ПОЛ базується на їх взаємодії з 0,8 % 2-тіобарбітуровою кислотою (ТБК), при цьому утворюється забарвлений комплекс, який екстрагується бутанолом. Вміст вторинних продуктів ПОЛ визначали колориметрично [160].

Визначення первинних та вторинних продуктів ПОЛ здійснювали у суспензії клітин кісткового мозку мишей. Суспензію клітин кісткового мозку отримували після декапітації мишей під хлороформним наркозом шляхом вимивання зі стегнових кісток середовищем Хенкса. Число клітин у розчині Хенкса складало 10^6 /мл. Дослідження проводили при температурі 20° С.

2.4.31 Статистичний аналіз отриманих експериментальних даних

Статистичний аналіз числових даних, що були отримані в експерименті здійснювалась за допомогою комп'ютерних програм Origin (перевірка на нормальність розподілу) и Statistica 6.0 (параметричний метод: t-розподілу) з поправкою Бонферроні. Отримані данні представлені у вигляді середнього арифметичного (M) із лінійним відхиленням (σ). При статистичному аналізі даних в серії експериментів із вакцинацією застосовували також коефіцієнт варіації (cv). У експериментах з перевірки алергізуючих властивостей БЕТП 9 застосовували метод пробіт-аналізу за Фінні [161, 162].

РОЗДІЛ 3

ХАРАКТЕРИСТИКА ЕЕПТ 9 ТА ЗАСТОСУВАННЯ МОДЕЛІ РАДІАЦІЙНО-ІНДУКОВАНОЇ ІМУНОДЕПРЕСІЇ ДЛЯ ОЦІНКИ ЙОГО ЕФЕКТИВНОСТІ

Відомі імунотропні, адаптогенні та репараційні ефекти біопрепаратів пов'язані з вибіркоким впливом їх структурних компонентів на фізіологічні процеси, особливо в умовах дії несприятливих зовнішніх факторів різноманітного генезу: хімічного, фізичного, біологічного, психоемоційного тощо [163].

На теперішній час вже отримано низку відомостей щодо складу екстрактів з ембріонів курей різного строку розвитку [118, 120].

Подальша деталізація складу екстрактів з курячих ембріонів розширить багаж даних та дозволить припустити імовірні фізіологічні принципи впливу, що ними здійснюються та дозволить окреслити нові перспективи використання таких субстанцій, а також може бути застосована за для стандартизації фармакологічно активної субстанції (екстракту).

3.1 Концентрація білка та рівень FGFb в складі ЕЕПТ 9 до та після крiовпливу

Дослідження концентрації білка у 10-ти зразках ЕЕПТ 9 виявило, що середнє його значення складає $0,77 \pm 0,05$ мг/мл.

У складі екстракту з вмісту цього цитокіну в триплетах коефіцієнт варіації його кількісних показників не перевищував 10 % (табл. 3.1) [164].

Концентрація білка (мг/мл) та вміст FGFb (нг/мл) в екстракті з ембріональних тканин птахів 9-ти діб розвитку до та після кріовпливу ($M \pm \sigma$)

Показник Досліджувана субстанція	Концентрація білка, мг/мл		FGFb, нг/мл	
	M	σ	M	σ
ЕЕТП 9-ти діб розвитку до кріовпливу	0,77	0,05	120,35	6,00
ЕЕТП 9-ти діб розвитку після кріовпливу	0,69	0,03	124,20	7,00

Значний вміст FGFb можливо пояснити надзвичайно широкою залученістю даного фактору у структуруванні та морфогенезі курячих ембріонів, на ранньому етапі ембріонального розвитку. Відомо, що з етапів формування первинної смужки вже реєструється експресія FGF. На 5-ту добу розвитку 9 членів родини FGF експресуються в багатьох анатомічних сайтах: мозку, серці, тулубі, нирках і кінцівках, де вони безпосередньо виконують функції клітинних мітогенів, стимуляторів диференціації, здійснюють хемотаксичні ефекти, виступаючи у ролі ключових регуляторів раннього ембріонального органогенезу [129–133].

3.2 Спектр амінокислот та жирних кислот в ЕЕТП 9

Останнім часом багато робіт присвячено дослідженням імуотропної дії окремих фракцій екстракту з курячих ембріонів різного строку розвитку [120, 134–137], пояснюючи означені ефекти їх конститuentами.

Визначення якісного амінокислотного складу показало, що в гідролізаті водорозчинної фракції ЕЕТП 9 містяться незамінні (треонін, валін, метіонін, ізолейцин, лейцин, фенілаланін, лізин), напівзамінні (цистин, гліцин, тирозин,

гістидин, аргінін) і замінні амінокислоти (аспарагінова, серин, глютамінова, пролін, аланін) (рис. 3.1).

В найбільшій кількості виявляється аргінін ($17,25 \pm 0,76$) мг/100 мл, фенілаланін ($17,81 \pm 0,52$) мг/100 мл, а також тирозин ($9,45 \pm 0,22$) мг/100 мл і лейцин ($8,17 \pm 0,23$) мг/100 мл.

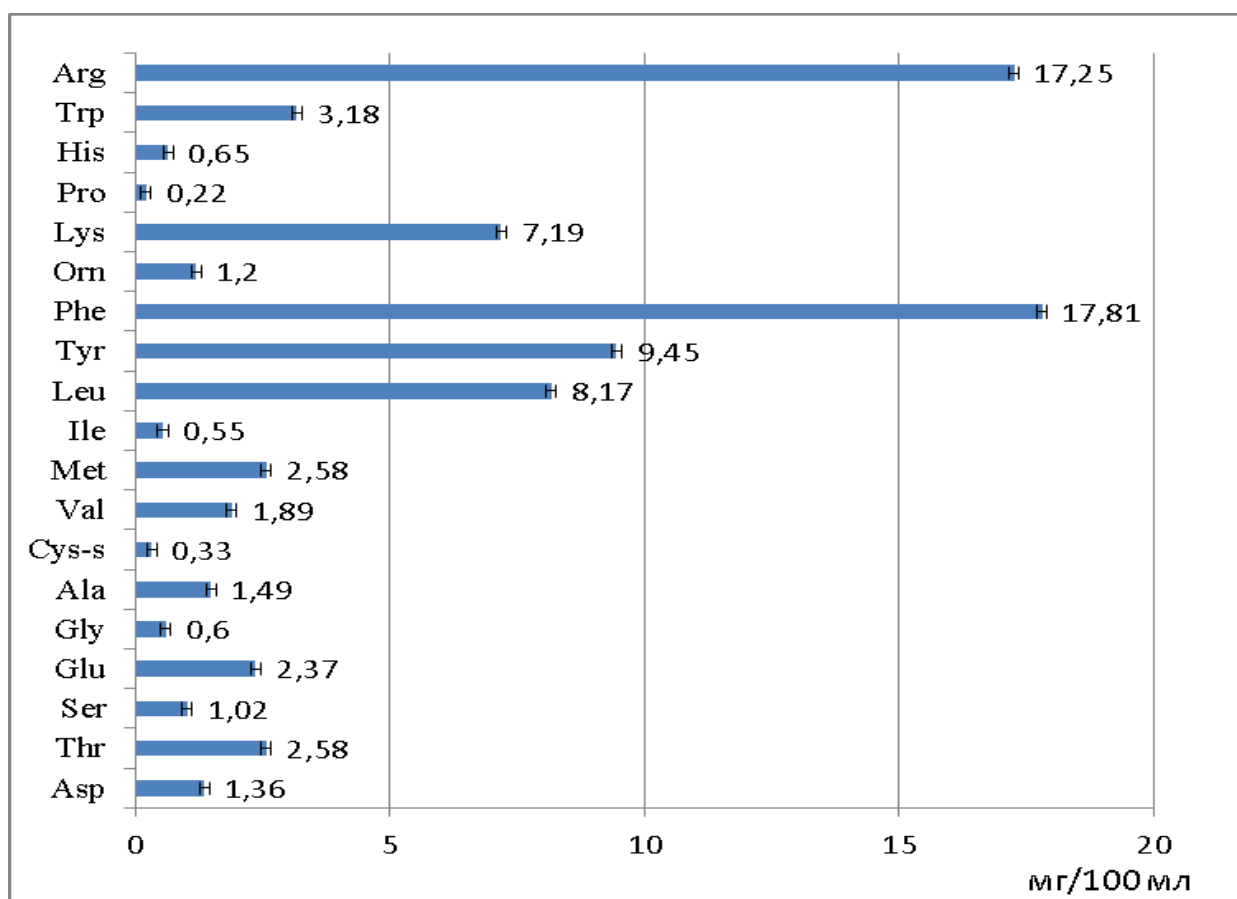


Рис 3.1. Амінокислотний склад гідролізату ЕЕТП 9

Якісне та кількісне дослідження жирнокислотного складу ЕЕТП 9 показало, що олеїнова ($8,18 \pm 0,40$) мг/100 мг, пальмітинова ($4,56 \pm 0,28$) мг/100 мг, лінолева ($2,49 \pm 0,11$) мг/100 мг і стеаринова кислоти ($1,76 \pm 0,09$) мг/100 мг містяться в ньому в найбільшій кількості (рис. 3.2).

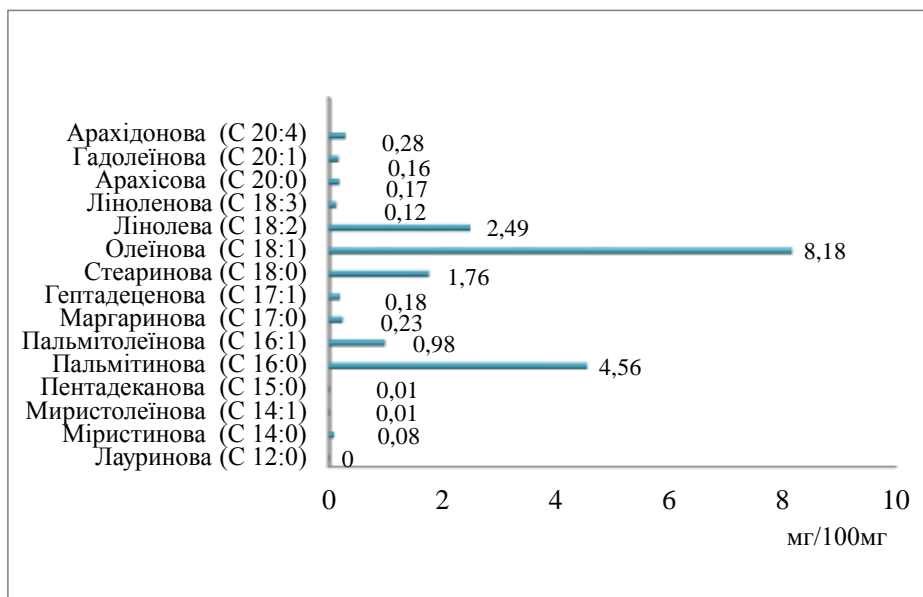


Рис 3.2. Жирнокислотний склад ЕЕТП 9 (в перерахунку на суху речовину, мг/100 мг)

Таким чином, показано, що у складі екстракту з ембріонів курей 9-ти днів розвитку містяться значні кількості аміно- (в найбільшій кількості аргінін, фенілаланін, а також тирозин і лейцин) та жирних кислот (олеїнова, пальмітинова, лінолева і стеаринова кислоти) [165].

3.3 Концентрація ІЛ-2, синтезованого спленоцитами та фагоцитарна активність перитонеальних макрофагів мишей із циклофосфамідною імунодепресією під впливом цільного ЕЕТП 9 та його фракцій *in vitro*

На початковому етапі роботи з огляду на вже відомі наукові експериментальні дані ми вважали за доцільне порівняти здатність жиророзчинної, водорозчинної фракцій та цільного ЕЕТП 9 до стимулювання

функціональної активності лімфоцитів та макрофагів *in vitro* та з'ясувати, чи мають переваги окремі фракції над застосуванням цільного ЕЕТП 9. Оскільки в роботі розглядається здатність ЕЕТП 9 до корекції кількісних та функціональних порушень стану імунної системи, раціональним вбачалося здійснення порівняльної оцінки на моделі циклофосфамідної імунодепресії (рис. 3.3 – 3.5).

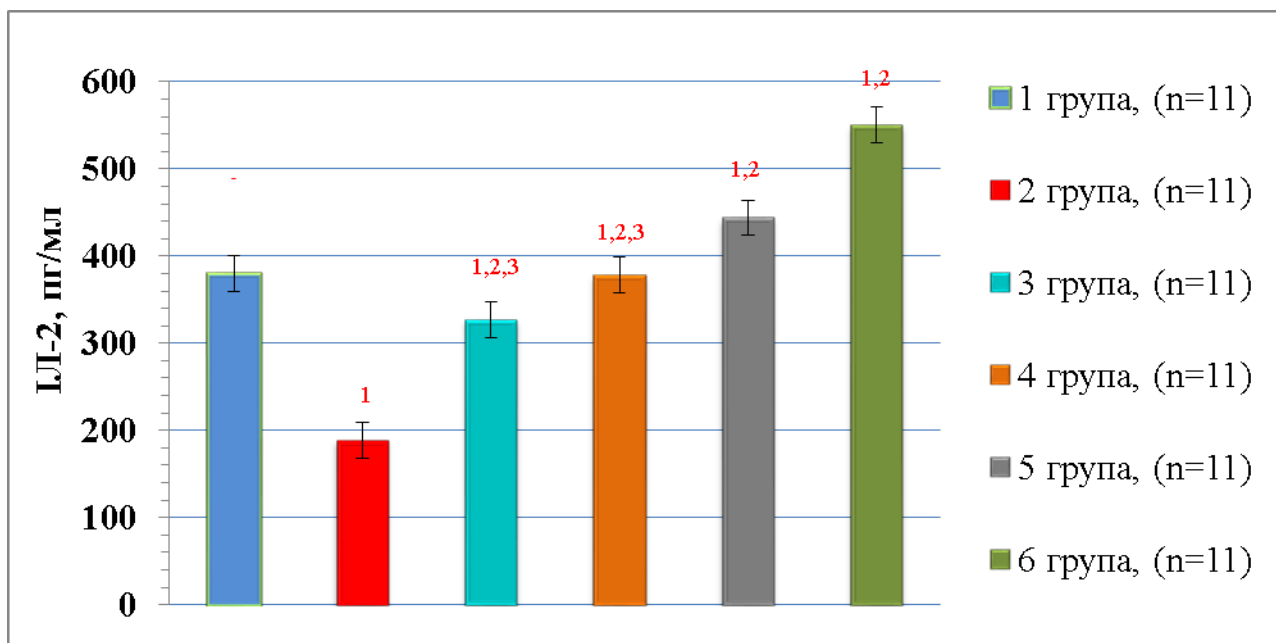


Рис. 3.3. Рівень продукції ІЛ-2 спленоцитами мишей з циклофосфамідною імунодепресією під впливом цільного ЕЕТП 9 та його фракцій *in vitro*: 1 група – клітини інтактних мишей, (n=11); 2 група – клітини мишей, яким вводили циклофосфамід (ЦФ), (n=11), 3 група – клітини мишей, яким вводили ЦФ, що інкубувалися із водорозчинною фракцією ЕЕТП 9; 4 група – клітини мишей, яким вводили ЦФ, що інкубувалися із жиророзчинною фракцією ЕЕТП 9; 5 група – клітини мишей, яким вводили ЦФ, що інкубувалися із цільним ЕЕТП 9; 6 група – клітини мишей, яким вводили ЦФ, що інкубувалися із ФГА (позитивний контроль); ¹ – достовірно відносно клітин інтактних тварин, $p \leq 0,05$; ² – достовірно відносно клітин тварин із ЦФ, $p \leq 0,05$. ³ – достовірно відносно клітин тварин із ЦФ та цільним ЕЕТП 9, $p \leq 0,05$

Встановлено, що сумісна інкубація спленоцитів, отриманих від мишей із циклофосфамідною імунодепресією як із цільним ЕЕТП 9 та і з його окремими фракціями *in vitro* потенціює рівень синтезу ІЛ-2 порівняно із групою мишей із циклофосфамідною імунодепресією. Найвиразніший ефект спостерігався у разі застосування цільного ЕЕТП 9, обробка яким спричиняла посилення синтезу спленоцитами мишей із ЦФ імунодепресією ІЛ-2 у 2,3 раза порівняно з необробленими клітинами цих тварин ($p \leq 0,05$) (рис. 3.3). Інкубація спленоцитів з водо- та жиророзчинною фракціями ЕЕТП 9 також викликала стимуляцію синтезу спленоцитами тварин з імунодепресією ІЛ-2: кількісні показники цього цитокіну у середовищі культивування досягали значень його спонтанної продукції клітинами інтактних тварин.

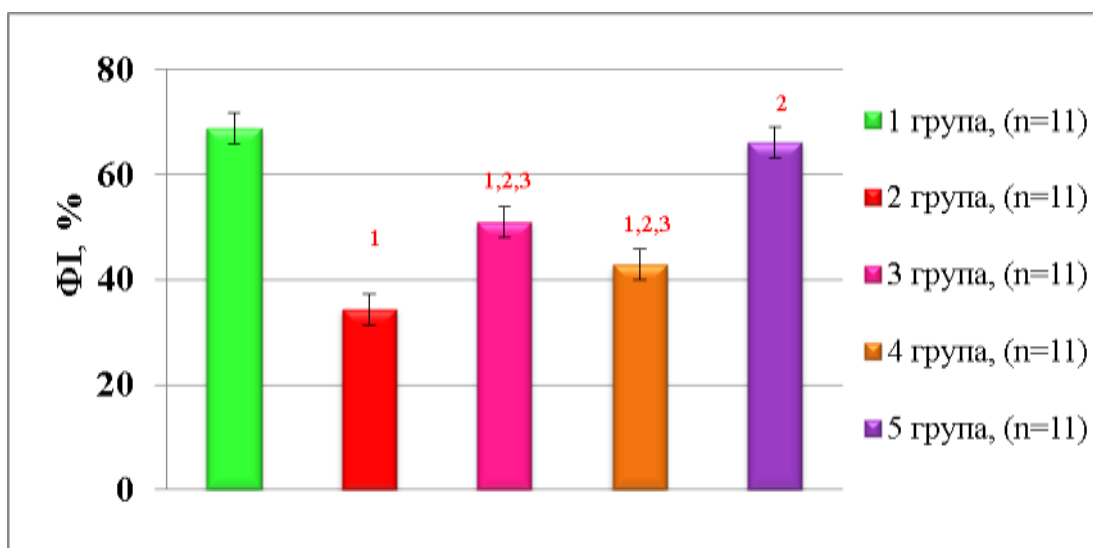


Рис. 3.4. Фагоцитарний індекс макрофагів мишей під впливом цільного ЕЕТП 9 та його фракцій за циклофосфамідної імунодепресії *in vitro*: 1 група – клітини інтактних тварин, (n=11); 2 група – клітини мишей, яким вводили ЦФ, (n=11); 3 група – клітини мишей, яким вводили ЦФ, що інкубувалися із водорозчинною фракцією ЕЕТП 9; 4 група – клітини мишей, яким вводили ЦФ, що інкубувалися із жиророзчинною фракцією ЕЕТП 9; 5 група – клітини мишей, яким вводили ЦФ, що інкубувалися із цільним ЕЕТП 9; ¹ – достовірно відносно інтактних тварин, $p \leq 0,05$; ² – достовірно відносно групи тварин із ЦФ, $p \leq 0,05$; ³ – достовірність відмінності даних відносно групи тварин із ЦФ та застосуванням цільного ЕЕТП 9, $p \leq 0,05$

Переважання дії цільного ЕЕТП 9 *in vitro* над його окремими фракціями спостерігалось і щодо фагоцитарної активності перитонеальних макрофагів (рис. 3.4).

Так у разі преінкубації із цільним ЕЕТП 9 фагоцитарний індекс перитонеальних макрофагів, отриманих від мишей із циклофосфамідною імунодепресією був вище у 1,7 раза порівняно із необробленими клітинами цих тварин, ($p \leq 0,05$), фагоцитарне число – в 1,8 раза, (рис. 3.4, 3.5) [166].

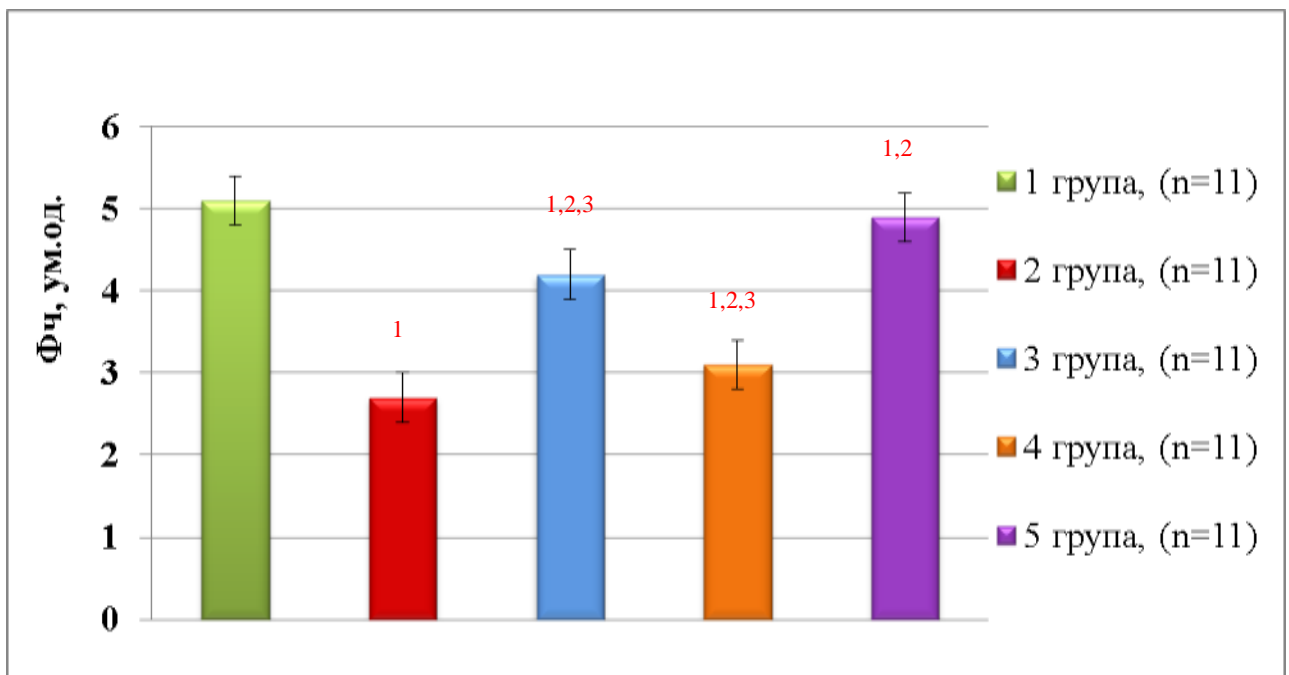


Рис. 3.5. Фагоцитарне число перитонеальних макрофагів мишей під впливом цільного ЕЕТП 9 та його фракцій за циклофосфамідної імунодепресії *in vitro*: 1 група – клітини інтактних тварин, (n=11); 2 група – клітини мишей, яким вводили ЦФ, (n=11); 3 група – клітини мишей, яким вводили ЦФ, що інкубувалися із водорозчинною фракцією ЕЕТП 9; 4 група – клітини мишей, яким вводили ЦФ, що інкубувалися із жиророзчинною фракцією ЕЕТП 9; 5 група – клітини мишей, яким вводили ЦФ, що інкубувалися із цільним ЕЕТП 9; ¹ – достовірно відносно інтактних тварин, $p \leq 0,05$; ² – достовірно відносно групи тварин із ЦФ, $p \leq 0,05$; ³ – достовірність відмінності даних відносно групи тварин із ЦФ та застосуванням цільного ЕЕТП 9, $p \leq 0,05$

При цьому ефекти водорозчинної фракції на зазначені показники були незначно нижчими за такі при обробці цільним препаратом. Модулювальний вплив жиророзчинної фракції на фагоцитоз перитонеальних макрофагів був слабким.

Слід зазначити, що жиророзчинна фракція ЕЕТП 9 чинила більш виразний стимулювальний вплив на синтез ІЛ-2 спленоцитами, що може зумовлюватися імуномодулювальними властивостями присутньої у її складі олеїнової кислоти.

3.4 Оцінка алергізуючих властивостей ЕЕТП 9

Виявлення алергізуючої дії потенційних лікарських засобів в експерименті є важливим етапом загального вивчення безпеки майбутніх профілактичних та терапевтичних препаратів, зокрема природного походження. Оскільки субстанції, що виявляють тропність щодо імунологічної реактивності організму, особливо за умови наявності імунопатології, можуть потенційно викликати стан гіперчутливості. Ймовірність розвитку подібної небажаної реакції з боку імунної системи визначається як власно її станом, так і кількістю та якістю компонентів, що складають досліджувану субстанцію. Особливо важливим є вивчення алергізуючих властивостей речовини у разі якщо вони вміщують протеїни, хоча і низькомолекулярного діапазону мас.

Під алергізуючими властивостями розуміють здатність речовини за її введення в організм викликати стан гіперчутливості, основою якої є імунологічні механізми [167].

В ході проведення оцінки анафілактогенної активності ЕЕТП 9 досліджували реакцію загальної анафілаксії.

Встановлено, що інтенсивність анафілактичної реакції за індексом реакції у контрольних тварин склав 0,2 (у 2 тварини з 11 спостерігався шок слабкої інтенсивності, у інших 9 тварин анафілактичних проявів не спостерігалось). В дослідній групі тварин, яким було введено ЕЕТП 9 у дозі 0,1 мг/кг індекс анафілаксії склав також 0,2; де так само у 2 тварин відзначено слабку анафілаксію.

В другій групі тварин, яким вводили ЕЕТП 9 у дозі 10 мг/кг індекс реакції склав 0,5 (у 3 тварин з 11 відмічена слабка анафілактична реакція та у 2-х тварин – помірний шок). В третій групі, тваринам якої вводили еталонний алерген – овальбумін індекс реакції був 3,6 (7 тварин з 11 загині, 4 тварини отримали тяжкий шок), (рис. 3.6).

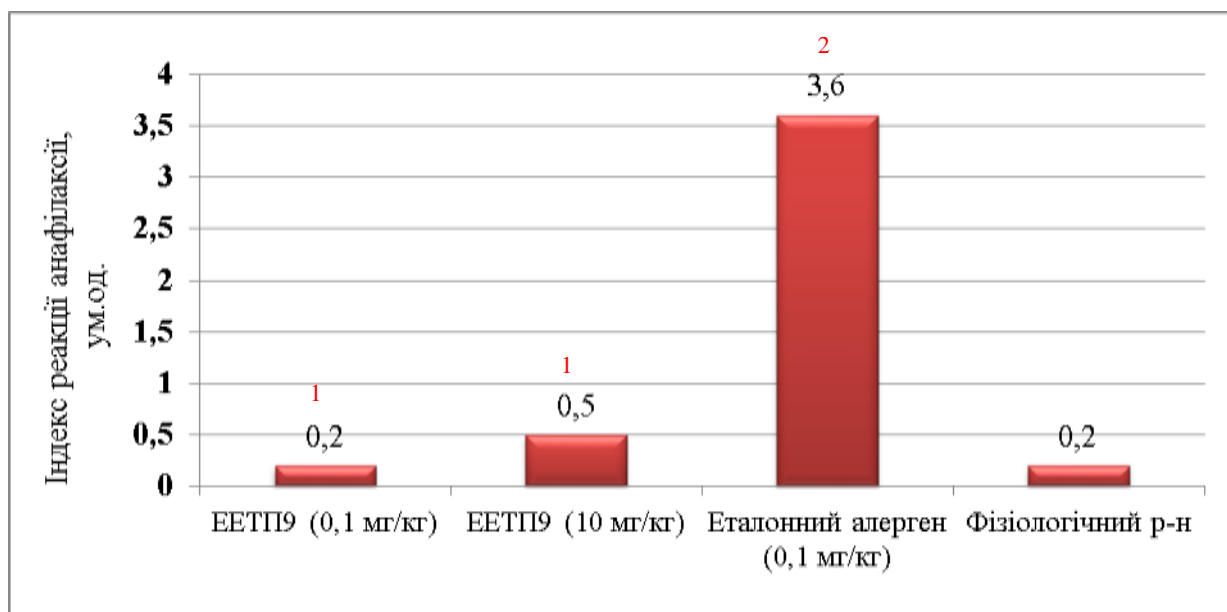


Рис. 3.6. Індекс реакції анафілаксії у мурчаків за впливу ЕЕТП 9: ¹ – достовірно відносно еталонного алергену, $p \leq 0,05$; ² – достовірно відносно застосування фізіологічного розчину, $p \leq 0,05$

Таким чином, при дослідженні загальної анафілактичної реакції на введення ЕЕТП 9 у експерименті відзначено досить низький рівень її розвитку за індексом реакції за Вейглом порівняно з еталонним алергеном – овальбуміном, що свідчить про алергічну безпеку досліджуваної субстанції [168].

3.5 Вплив ЕЕТП 9 на показники виживаності мишей із радіаційною імунодепресією

Оцінка ефективності ЕЕТП 9 здійснювалась шляхом спостереження за 30-ти добовою виживаністю, підрахунком середньої тривалості життя мишей, що загинули й спостереженням за динамікою їх загибелі при опроміненні в дозі LD₈₀₋₁₀₀ (9 Гр). Проводили також оцінку ФЗД під впливом ЕЕТП 9.

В ході спостереження за станом тварин із радіаційною імунодепресією вже на 1-шу добу спостерігалось зниження рухливої активності, зниження апетиту, сонливість, диспептичні явища з боку шлунково-кишкового тракту.

Загибель перших 4 особин у групі імунодепресованих тварин була зареєстрована вже на 2-гу добу спостереження, чого не відбувалося за введення ЕЕТП 9 мишам. На 5-ту добу пало ще 4 тварини (в сумі 38,1 % групи після дії γ -випромінювання). Загибель перших 3 тварин у групі із застосуванням екстракту (14,3 % групи) була відмічена лише на 7-му добу спостереження на відміну від групи без застосування ЕЕТП 9, де смертність на цей час досягла 57,14 % групи. 100 % загибель тварин відмічена на 13-ту добу в групі, тварини якої зазнали впливу в летальній дозі випромінювання. Під впливом ЕЕТП 9 було зареєстровано 61,9 % загибель в групі, (рис. 3.7).

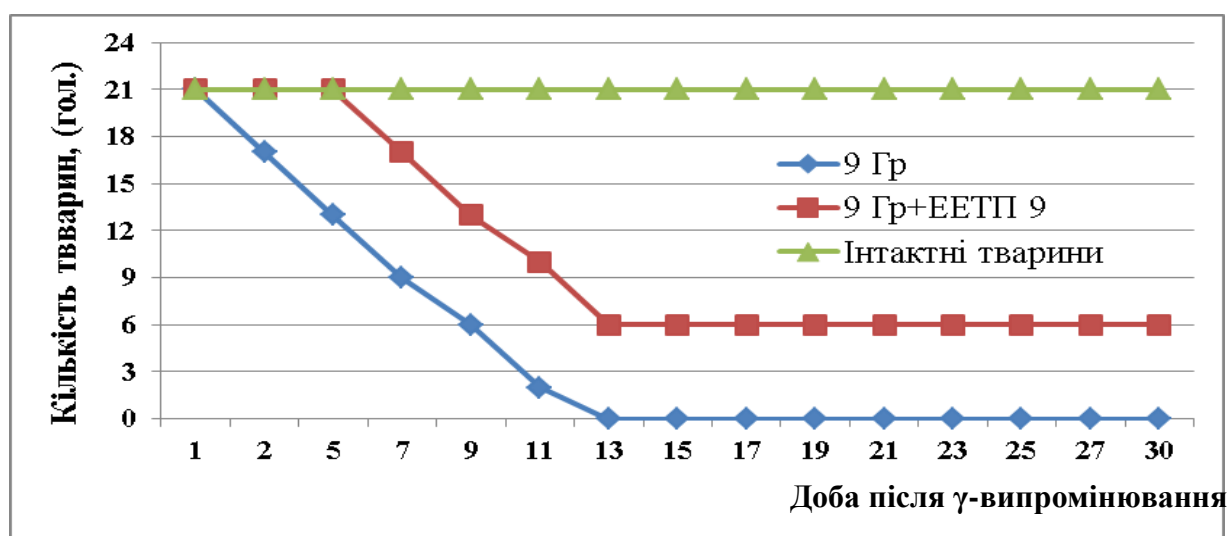


Рис. 3.7. Динаміка виживаності мишей після їх опромінення в дозі 9 Гр під впливом ЕЕТП 9

Таким чином, в ході дослідження динаміки виживаності мишей, що піддавалися дії γ -випромінювання в дозі 9 Гр) (LD_{80-100}) застосування ЕЕТП 9 забезпечувало 38,1 % виживаність мишей протягом 30-ти діб після впливу [169].

Збільшилась також і середня тривалість життя тварин, що були опромінені в летальній дозі за умови введення ЕЕТП 9 з 7-ми до 10-ти діб, (рис. 3.8).

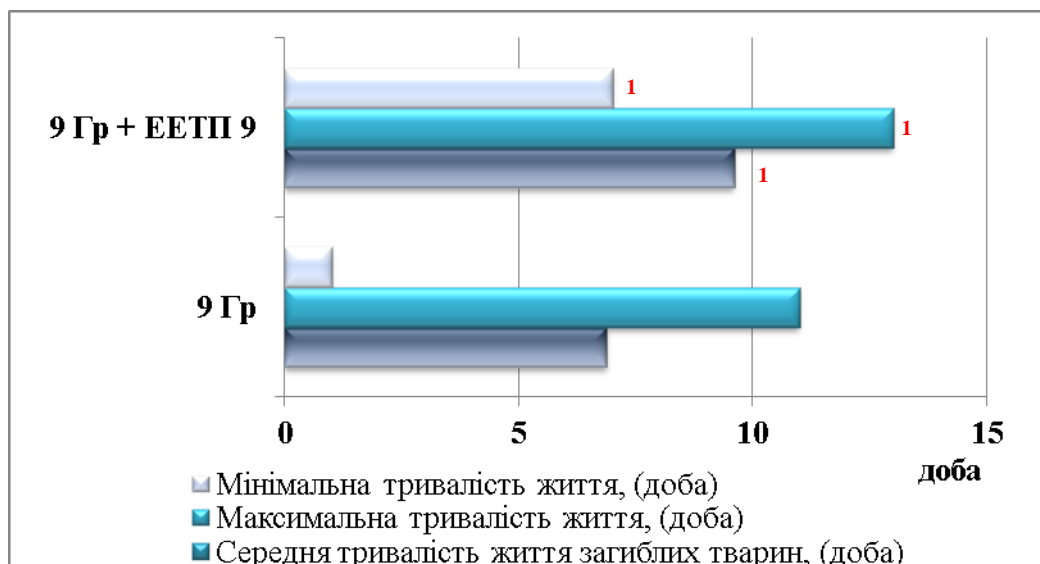


Рис. 3.8. Середня тривалість життя тварин, підданих дії γ -випромінювання в дозі 9 Гр, за умови застосування ЕЕТП 9 та без нього: ¹ – достовірно відносно групи тварин, що були опромінені в дозі 9 Гр, $p \leq 0,05$

Інтегральним показником ефективності препарату також є величина фактору зміни дози або ФЗД.

В серії пілотних експериментів було встановлено, що доза γ -випромінювання, яка викликає 50 % загибель мишей протягом 30-ти діб спостереження ($LD_{50/30}$) становила 6 Гр. Одноразове застосування ЕЕТП 9 мишам в дозі 0,1 мг/кг за добу перед дією випромінювання зрушило $LD_{50/30}$ до 7 Гр. Таким чином, ФЗД для ЕЕТП 9 за одноразового застосування становив 1,16 (рис. 3.9).

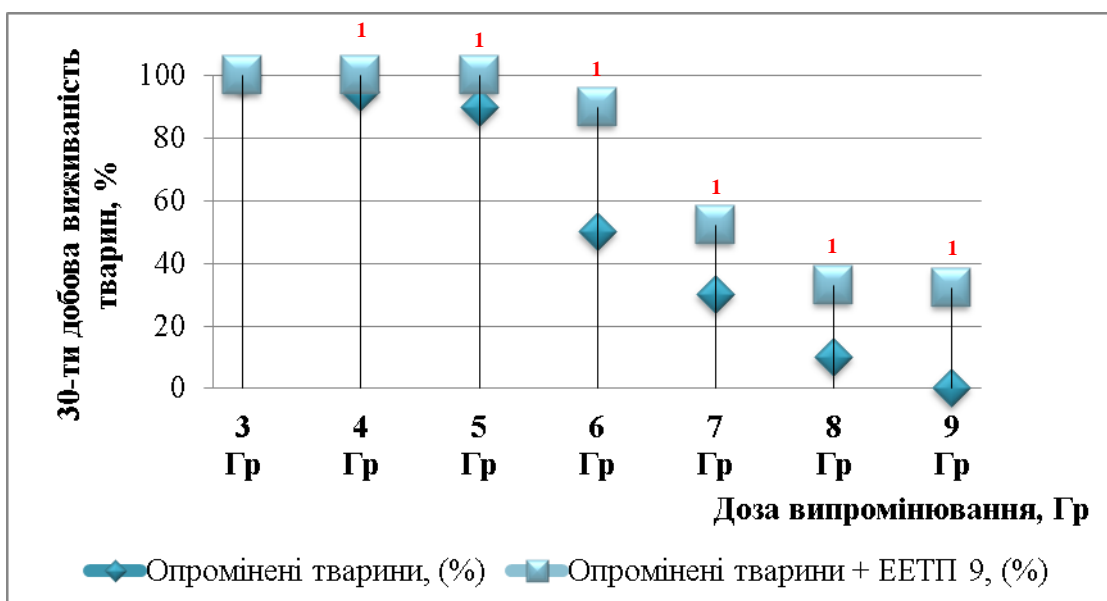


Рис. 3.9. Вплив ЕЕТП 9 на 30-ти добову виживаність мишей, що були піддані дії γ -випромінювання в діапазоні доз 3 – 9 Гр: ¹ – достовірно відносно групи тварин, що були опромінені та не отримували ЕЕТП 9, $p \leq 0,05$

Властивості ЕЕТП 9, що сприяють підвищенню виживаності тварин в умовах дії такого ушкоджуючого фактору як іонізуюче випромінювання свідчать про можливість його використання за індукованих імунодепресій.

3.6 Гістологічне дослідження органів імунної системи після введення ЕЕТП 9 мишам із радіаційною імунодепресією

3.6.1 Вплив ЕЕТП 9 на морфологію стегнової кістки тварин із радіаційною імунодепресією

Відомо, що стан кісткової тканини та кісткового мозку є одним з головних критеріїв оцінки дії імунодепресивних факторів різного генезу [170–172].

Враховуючи високу чутливість стовбурових клітин кісткового мозку до іонізуючого випромінювання, актуальним є пошук засобів, що, зокрема, здатні впливати на їх проліферацію і диференціацію за радіаційної імунодепресії. У

зв'язку з цим, представляє інтерес вивчення морфології стегнової кістки імунODEпресованих тварин за застосування ЕЕТП 9.

При мікроскопічному дослідженні препаратів стегнової кістки інтактних мишей, підтверджено нормальну будову усіх шарів її кісткової тканини, а також строми та паренхіми кісткового мозку. Зовнішній шар окістя утворений щільною сполучною тканиною, внутрішній шар представлений остеогенними камбіальними клітинами, преостеобластами і остеобластами різного ступеня диференціювання. Шар остеонів чітко визначався між зовнішньою і внутрішньою кістковими пластинками, в центрі яких знаходились канали остеонів та кровоносними судинами. У кісткових пластинках чітко диференціюються лакуни, всередині яких містяться остеоцити. Від компактної частини трубчастої кістки в кістковомозкову порожнину вдаються кісткові трабекули. Строма утворена ретикулярною тканиною, жировими клітинами і судинами. Паренхіму складають гемопоетичні острівці, що складаються з гемопоетичних клітин на різних стадіях диференціювання (рис. 3.10).

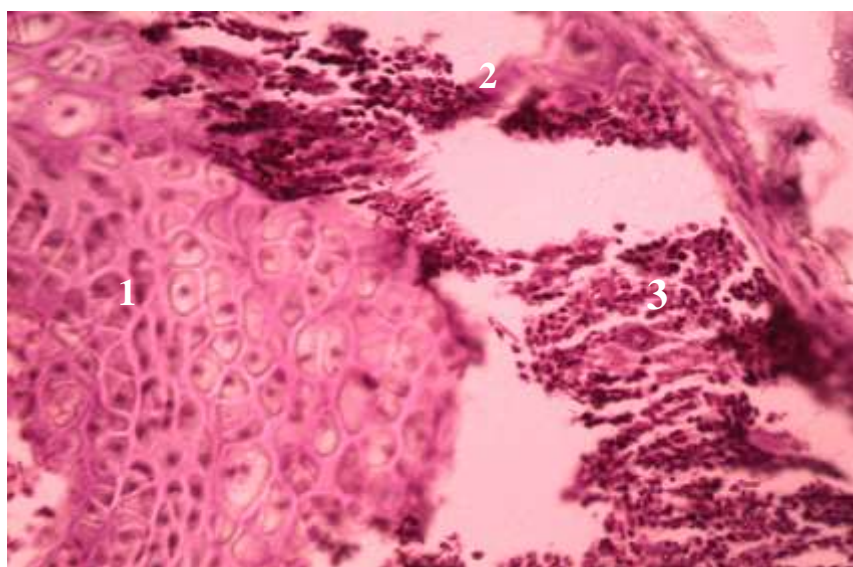
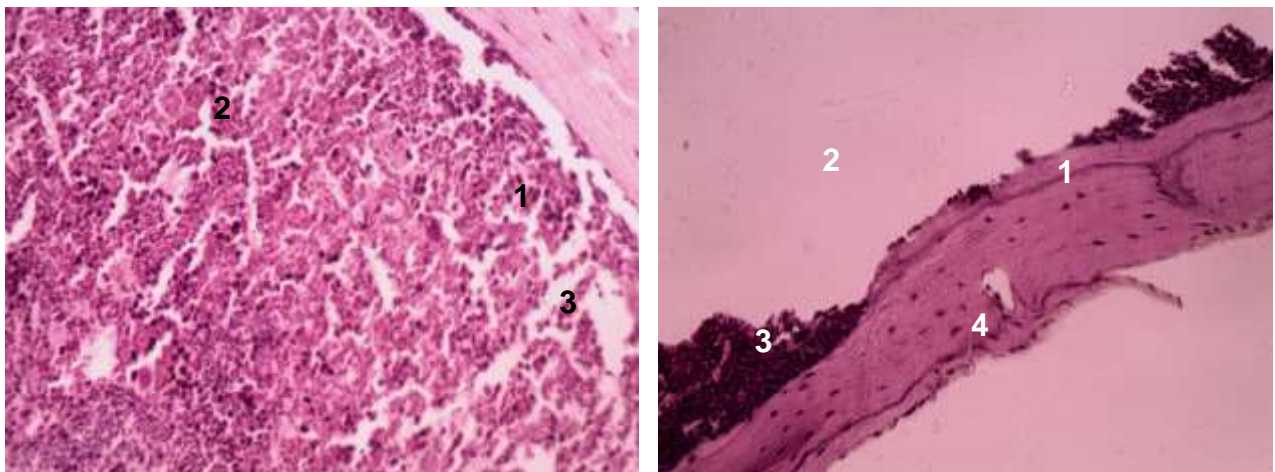


Рис. 3.10. Гістологічний препарат стегнової кістки інтактної тварини: кісткова тканина (1), кістковомозкова порожнина (2), гемопоетична тканина (3); Забарвлення: гематоксилін-еозин, $\times 400$

В групі тварин, які були піддані впливу, що викликає імунодепресію на 7-му добу експерименту в кістковій тканині тварин виявлено виражені ознаки дистрофії стромы і паренхіми кісткового мозку, резорбцію кісткової тканини, а також порушення кровопостачання кістки (рис. 3.11 А).

Після введення екстракту з ембріональних тканин птахів мишам на 7-му добу спостереження розгорталася зовсім інша морфологічна картина кісткової тканини. У структурі кісткової тканини в умовах застосування ЕЕТП 9 на відміну від групи порівняння не було відмічено такої вираженої резорбції кісткової тканини. Кісткові трабекули губчастої кістки в метафізарній ділянці, були значно ширшими в порівнянні з опроміненими тваринами, котрим не застосовували досліджувану субстанцію. У зовнішньому шарі кісткових пластинок не відмічено дезорієнтованості колагенових волокон на відміну від контролю (рис. 3.11 А).



А

Б

Рис. 3.11. Гістологічний препарат стегнової кістки мишей (7-ма доба експерименту) із радіаційною імунодепресією за застосування ЕЕТП 9 (А) та без нього (Б) А: Кісткові трабекули губчастої кістки, вдаються в кістковомозкову порожнину, широкі, неущільнені (1); гіперплазія гемопоетичної тканини (2); остецити нормальної структури (3). Б: Дистрофічно змінені кісткові трабекули (1); кістковомозкова порожнина (2), гіпоплазія гемопоетичної тканини (3), дистрофічні зміни остеоцитів (4). Забарвлення: гематоксилін-еозин, $\times 400$

На відміну від контролю в кістковій тканині тварин даної групи виявлено велику кількість остеобластів, що свідчить про ініціювання остеогенезу і процесів кровотворення в кістковому мозку опромінених тварин.

За застосування ЕЕТП 9 вдалося попередити розвиток структурних перебудов стромального мікрооточення стегнової кістки, що у групи контролю виражалися в гіпоплазії гемопоетичної тканини де спостерігались хаотичні, локальні скупчення гемопоетичних клітин в стромі стегнової кістки, а також збільшення кількості адипоцитів, які на відміну від остеобластів є інгібіторами гемопоезу (рис. 3.11 Б).

Вищенаведене супроводжувалося активізацією гемопоезу в матриці стегнової кістки, кількість бластних форм значно переважало над більш диференційованими клітинами кісткового мозку.

На 14-ту добу після імунодепресуючого впливу нормалізації морфологічної структури стегнової кістки у тварин не спостерігалось. В ці строки спостереження дистрофічні зміни паренхіми кісткового мозку мали виражений характер (рис. 3.12).

На 14-ту добу спостереження в кістковій тканині тварин, яким вводили ЕЕТП 9, порівняно з контролем спостерігалися прогресивні зміни у структурі тканини. Поглиблень і виїмок в компактній тканині кістки діафізу з боку кістковомозкової порожнини не виявлено. У зовнішньому шарі загальних кісткових пластинок визначалися колагенові волокна, що йдуть паралельно один одному в різних напрямках (рис. 3.12). В цілому в деяких полях зору кісткова тканина не відрізнялася від норми. Компактна речовина діафізу мала нормальну будову.

В кістковому матриці такої активізації гемопоезу як на 7-му добу експерименту не спостерігалось, однак кількість ретикулярної тканини (у вигляді тонких оксифільних прошарків) була нормальною.

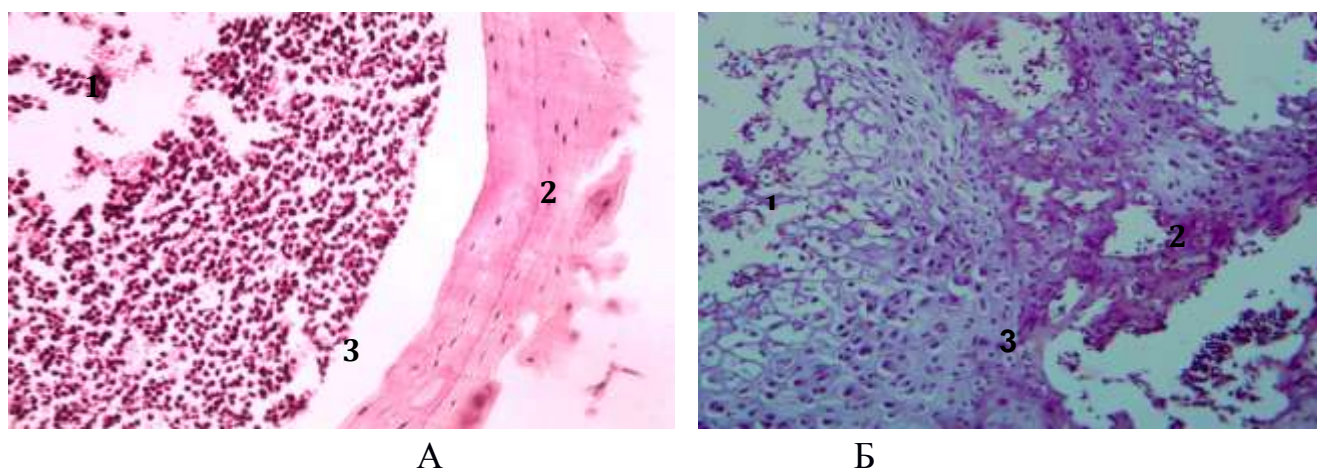


Рис. 3.12. Гістологічний препарат стегнової кістки миші із радіаційною імунодепресією за застосування ЕЕТП 9 (А) та без нього (Б) (14-та доба експерименту) А: гемопоетична тканина (1); нормальна структура кісткової тканини (2), велика кількість остеобластів (3). Б: порушення остеоцитів (1), збільшення кількості адипоцитів (2); зменшення ретикулярної тканини (3). Забарвлення: гематоксилін-еозин $\times 400$

У тварин за застосування ЕЕТП 9 на відміну від групи контролю не було відзначено переважання клітин еритроїдного паростка над клітинами лейкоцитарного ряду, які ідентифікувалися за гіперхромним забарвленням гемопоетичних клітин. Мікроскопічно число каріоцитів в умовах застосування ЕЕТП 9 було вищим ніж у тварин групи порівняння, де зниження відбувалось за рахунок клітин лейкоцитарного паростка.

В полі зору виявлялися поодинокі адипоцити, тобто такого розростання жирової тканини як у контролі відмічено не було. В цілому структура кісткової тканини даної групи тварин не відрізнялася від інтактної (рис. 3.12).

Таким чином, проведене морфологічне дослідження стану кісткового мозку мишей із радіаційно-індукованою імунодепресією за дії ЕЕТП 9 демонструє його здатність до запобігання вираженим порушенням структури цього кровотворного органу, зокрема явищ дистрофії гемопоетичної тканини, порушення остеогенезу

та кровопостачання, що спостерігаються на 14-ту добу у мишей контрольної групи [173].

3.6.2 Вплив ЕЕТП 9 на морфологічний стан селезінки мишей із радіаційною імунодепресією

Відомо, що селезінка виконує важливі гематологічні та імунологічні функції, формуючи генералізовану імунну відповідь на проникнення антигену, запальний процес або будь-яке інше порушення гомеостазу [174].

Гістологічне дослідження селезінки інтактних мишей, показало її нормальну будову (рис. 3.13). У капсулі органу визначалися фібробласти і невелика кількість гладком'язових клітин. Співвідношення червоної і білої пульпи зрушено в бік червоної пульпи, що складається з ретикулярної тканини з розташованими в ній форменими елементами крові та численними кровоносними судинами, головним чином, синусоїдного типу, що свідчить про нормальне кровонаповнення органу (рис. 3.14).

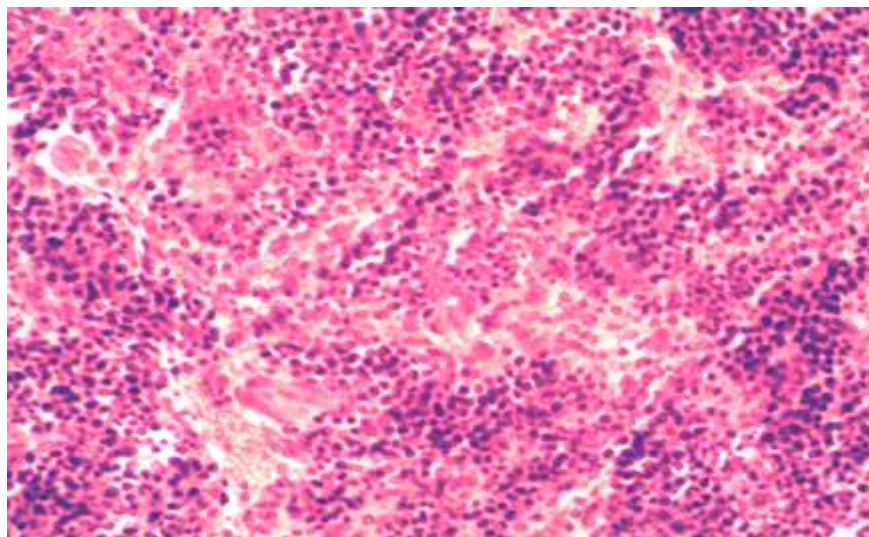


Рис. 3.13. Гістологічний препарат селезінки інтактної миші. Фолікули білої пульпи чітко відокремлені від червоної пульпи (1). Забарвлення: гематоксилін-еозин $\times 400$

У розташованих між синусами пульпарних тяжках виявляються вогнища плазмоцитогенезу. Лімфоїдна тканина (біла пульпа селезінки) розташовується в адвентиції її артерій у вигляді кулястих скупчень або подовжених лімфатичних піхв (лімфатичні фолікули).

На 7-му добу спостереження після індукції радіаційної імунодепресії стан селезінки мишей характеризувався низкою структурних патологічних змін, що виражалися у порушенні кровопостачання органу, зміні співвідношення червоної та білої його пульп та зниженні загальної клітинності.

У разі введення тваринам ЕЕТП 9 морфологія селезінки на 7-му добу після опромінення відрізнялася від групи порівняння. Просвіт вен в пульпі органу був розширений, однак агрегація формених елементів не виявлялася. Венозного повнокров'я після застосування ЕЕТП 9 констатовано не було. Судинна стінка вен та артерій не мала ознак набряку, ядра фібробластів і гладком'язових клітин чітко забарвлювалась гематоксиліном.

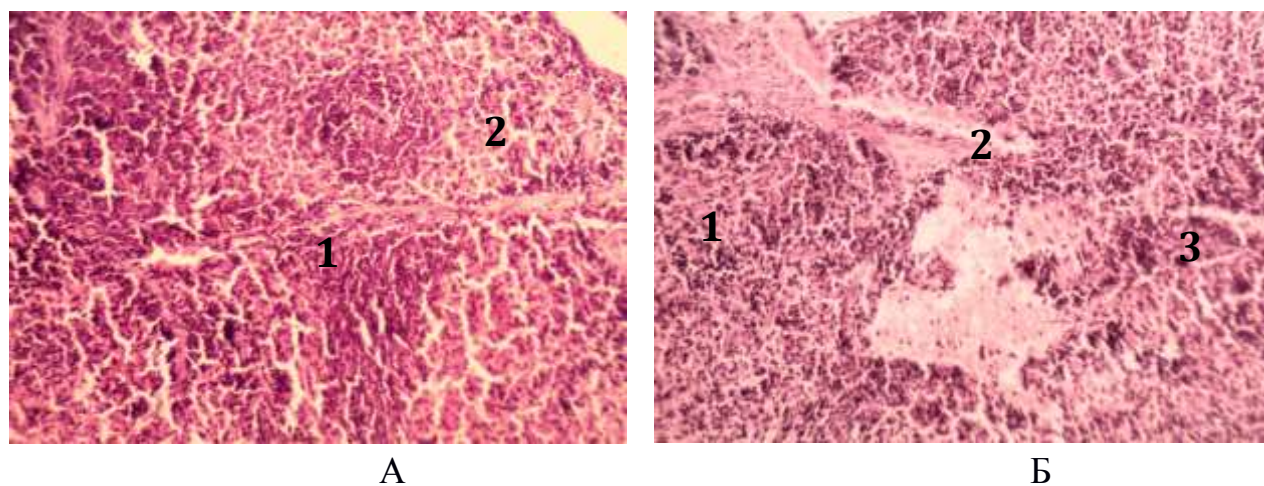


Рис. 3.14. Гістологічний препарат селезінки миші за введення ЕЕТП 9 (А) та без нього (Б) мишам із радіаційною імунодепресією (7-ма доба) А: Просвіти синусоїдів в пульпі органу розширені (1), фолікули різних розмірів (2), потовщення трабекул (3). Б: Співвідношення червоної і білої пульпи зрушено в бік білої, синусоїди розширені (1), порушено контурування фолікулів (2), в пульпі селезінки масивні крововиливи (1). Забарвлення: гематоксилін-еозин $\times 200$

Вищевикладене свідчить про те, що кровопостачання органу порушено значно меншою мірою порівняно з контролем.

У адвентиції артерій, які пронизують селезінку, визначалася лімфоїдна тканина у вигляді округлих або овальних скупчень – лімфатичних фолікулів з численними сполучнотканинними тяжами. Розміри фолікулів, в центрі яких простежується добре диференційований гермінативний центр, в селезінці опромінених мишей значно більше, ніж в нормі. Також було відзначено зменшення щільності клітин в фолікулах селезінки, яке пов'язане із збільшенням кількості макрофагів і бластних форм, що мають великий обсяг цитоплазми. Співвідношення білої і червоної пульпи зрушено в бік білої, але не настільки виражено, як було зазначено у контрольній групі. Відзначено також, що кількість гранулоцитів і мегакаріоцитів була значно більшою в білій пульпі селезінки у тварин даної групи. Число гермінативних центрів у пульпі селезінки була меншою порівняно з контролем. При цьому вираженою активації лімфопоезу виявлено не бул (рис. 3.14).

На 14-ту добу після індукції радіаційної імунодепресії в селезінці контрольної групи тварин в ході гістологічного дослідження все ще були виявлені характерні для імунодефіцитних станів зміни: повнокров'я, ексудація і виражена інфільтрація лейкоцитами пульпи.

Після введення ЕЕТП 9 на 14-ту добу спостереження морфологічна структура селезінки відрізнялася від групи порівняння.

Фолікули в селезінці тварин залишалися збільшеними в обсязі, при цьому їх гермінативні центри і в цілому структура погано диференціювалися. У маргінальній зоні фолікулів відзначено велику кількість мегакаріоцитів та нейтрофілів, чого не спостерігалось у контролі (рис. 3.15).

Незважаючи на те, що кровонаповнення органу тварин із імунодепресією після введення ЕЕТП 9 не нормалізувалося в ці строки, подібних до групи контролю крововиливів виявлено не було. У разі застосування ЕЕТП 9 на 14-ту

добу експерименту не виявлено некротичних змін тканинних елементів та розростання сполучнотканинних тяжів подібних до групи порівняння.

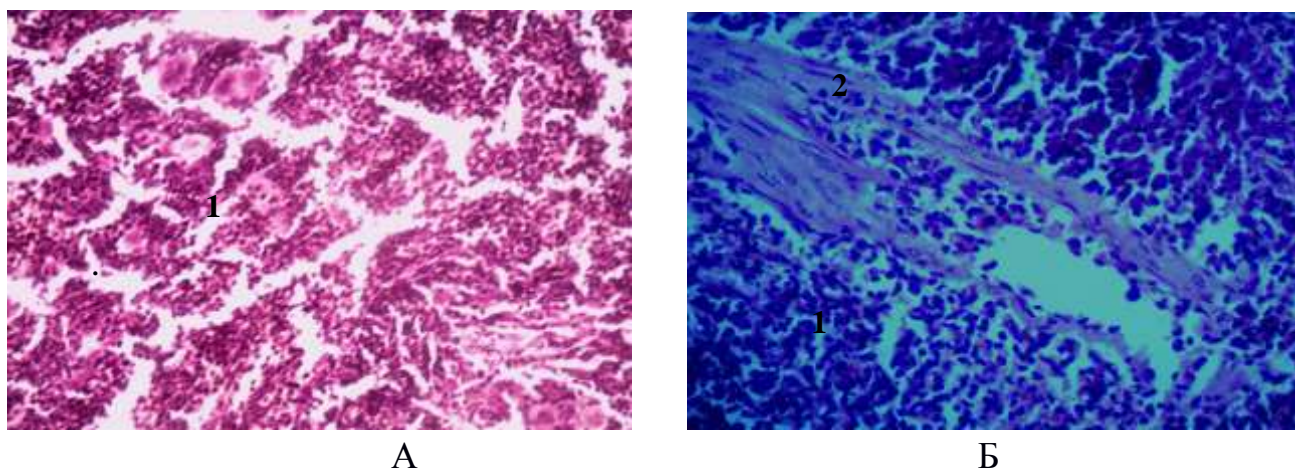


Рис. 3.15. Гістологічний препарат селезінки миші за застосування ЕЕТП 9 (А) та без нього (Б) мишам із радіаційною імунодепресією (14-та доба)
 А: Мегакаріоцити (1). Б: Лейкоцитоз (1), розростання сполучнотканинних тяжів (2). Забарвлення: гематоксилін-еозин $\times 400$

Клітини сполучної тканини не мали візуальних відмінностей від мишей інтактної групи. Спостерігалася також нормалізація співвідношення білої та червоної пульпи органу, коли на цю добу спостереження у тварин групи порівняння спостерігалася переважання білої пульпи, а червона пульпа, що займала відносно невелику площу, містила безліч гемокапілярів (рис. 3.15).

Таким чином, гістологічне дослідження селезінки мишей, яким застосовували ЕЕТП 9 демонструє здатність вказаної субстанції до ініціювання прискорення нормалізації архітектоніки даного органу в умовах радіаційної імунодепресії.

3.6.3 Вплив ЕЕТП 9 на морфологію тимусу мишей із радіаційною імунодепресією

За гістологічного дослідження тимусу інтактних мишей, спостерігалася нормальна долькова будова цього органу. Чітко диференціювався лімфоїдний, й епітеліальний компоненти. Кіркова й мозкова речовини дольок тимусу розділені щільно васкуляризованою кірково-мозковою зоною, (рис. 3.16). Трабекули дольок добре розпізнаються. Кіркова речовина інфільтрована незрілими Т-лімфоцитами. Крупні лімфоїдні клітини виявлено в підкапсулярній зоні коркової речовини тимусу. Мозкова речовина мала меншу кількість лімфоцитів у порівнянні з корковою й вміщувала одиничні кулясті тільця Гассала. В мозковій речовині органу виявлено невелику кількість макрофагів. Судини органу помірно повнокровні (рис. 3.16).

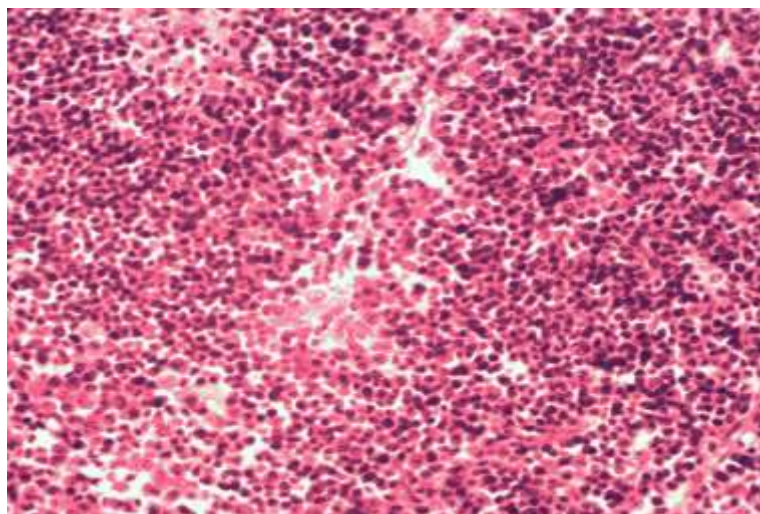
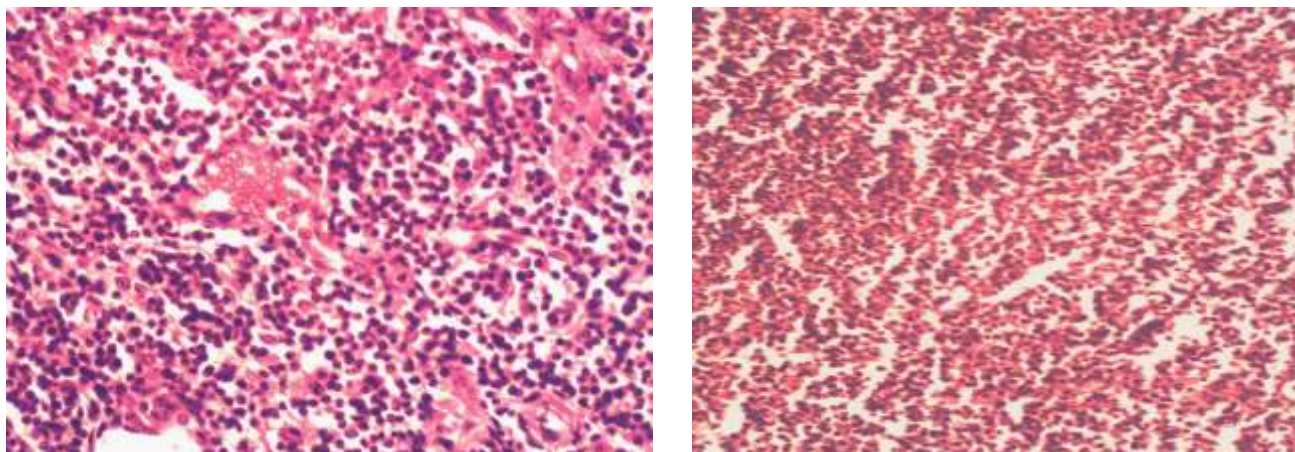


Рис. 3.16. Гістологічний препарат тимусу інтактної миші. Забарвлення: гематоксилін-еозин $\times 400$

Після індукції радіаційної імунодепресії в тимусі тварин на 7-му добу були відмічені зміни, що супроводжувалися зменшенням кількості лімфоцитів, особливо в корковій речовині. Межа між корковою та мозковою речовинами була менш помітною через зниження кількості лімфоцитів. Також було відзначено

розростання епітеліальної стромы, збільшення кількості багатошарових епітеліальних тілець Гассаля й макрофагів, що свідчить про деградацію клітин мозкової речовини. Кровопостачання органу було порушено через дилатацію й стаз кровоносних судин.

В ході гістологічного дослідження тимусу мишей із радіаційною імунодепресією із застосуванням ЕЕТП 9 на 7-му добу експерименту спостерігали незначне порушення кровопостачання органу. В гістологічних препаратах тимусу даної групи тварин відзначено збільшення зони коркової речовини. Чітко диференціювалася межа між корковою й мозковою зонами, й епітеліальний мережевий остов залози. Необхідно зазначити той факт, що в тимусі даної групи тварин виявлялися регенераційні процеси, про що свідчить активна проліферація лімфобластів й менша кількість тілець Гассаля в середній частині мозкової речовини у порівнянні зі зразками, що були отримані від імунодепресованих тварин (рис. 3.17).



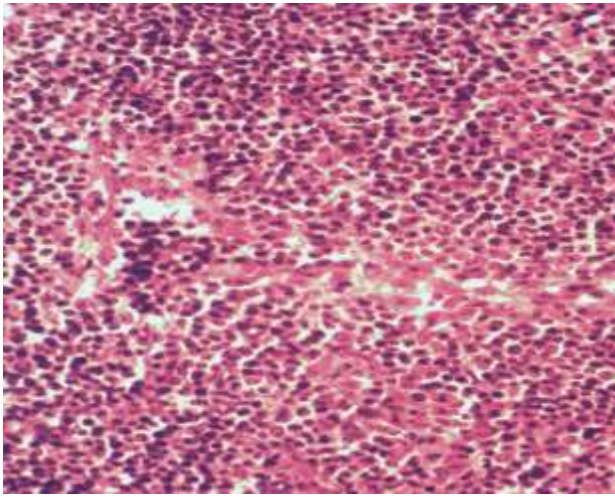
А

Б

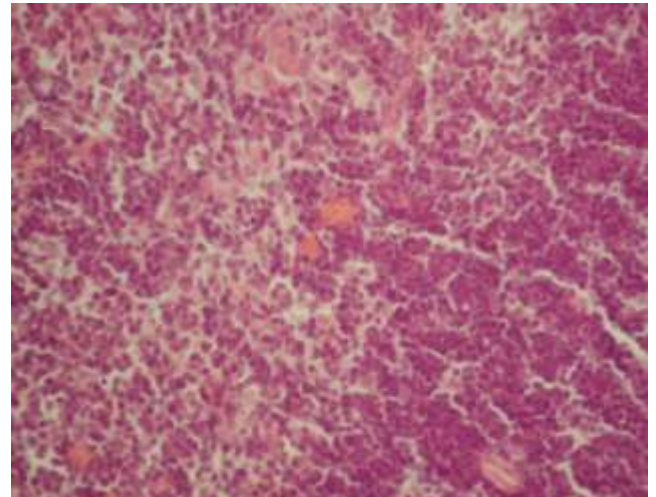
Рис. 3.17. Гістологічний препарат тимусу мишей із радіаційною імунодепресією після введення ЕЕТП 9 (А) та без нього (Б) (7-ма доба). Забарвлення: гематоксилін-еозин $\times 400$

Після введення ЕЕТП 9 тваринам із радіаційною імунодепресією морфологія органу на 14-ту добу експерименту значно відрізнялись від

контрольної. В першу чергу, необхідно відзначити кращу мікроциркуляцію крові органу порівняно з контролем: між- та внутрішньодолькові артерії були менш розширеними. Чітко диференціювались ендотеліальні клітини багаточисельних гемокапілярів. Відомо, що ці клітини утворюють гематотканинний бар'єр, що захищає лімфоцити у стані диференціювання, від надлишку антигенів. В середній частині мозкової речовини визначались небагаточисельні й різні по формі тільця Гассала (рис. 3.18). Границя між корковою й мозковою речовиною за дії ЕЕТП 9 чітко диференціювалась.



А



Б

Рис. 3.18. Гістологічний препарат тимусу мишей із радіаційною імунодепресією за дії ЕЕТП 9 (А) та без нього (Б), (14-та доба). Забарвлення: гематоксилін-еозин $\times 200$

Таким чином, виходячи з проведених нами морфологічних досліджень, було встановлено, що застосування ЕЕТП 9 мишам із радіаційною імунодепресією деякою мірою попереджає дистрофічні зміни тимусу й стимулює проліферацію лімфоїдних клітин [175].

РОЗДІЛ 4

ВІДНОВЛЕННЯ КЛІТИННОГО СКЛАДУ ОРГАНІВ ГЕМОПОЕЗУ ТА ІМУНОГЕНЕЗУ ПІД ВПЛИВОМ ЕЕТП 9 У МИШЕЙ ІЗ РАДІАЦІЙНОЮ ІМУНОДЕПРЕСІЄЮ

4.1 Нормалізація абсолютного числа каріоцитів кісткового мозку мишей із радіаційною імунодепресією під впливом ЕЕТП 9

За дослідження абсолютного числа ядерних клітин в кістковому мозку мишей із радіаційною імунодепресією було встановлено його достовірне зниження вже на 1-шу добу спостереження, коли воно складало 28 % від значень у інтактних тварин. На 3-тю добу відбулося максимальне зниження цих клітин – 10,5 % від нормального рівня у інтактних тварин. Оскільки в експерименті був обраний режим сублетальної радіаційної імунодепресії, то з плином часу спостерігалось відновлення загального числа ядерних клітин в кістковому мозку дослідних тварин, і на 14-ту добу реєструвалось його підвищення, коли число цих клітин становило 59 % від норми (рис. 4.1).

Після введення ЕЕТП 9 мишам із радіаційною імунодепресією число ядерних клітин кісткового мозку не зазнало такого ж зниження, як у тварин групи порівняння. Так, на 1-шу добу спостереження загальне число ядерних клітин у тварин цієї групи становило – 58,3 % норми. В період найбільшого зниження – на 3-тю добу – число досліджуваних клітин складало 44,7 % від норми порівнянно з 10,5 % у мишей із імунодепресією, як вже зазначалося. Під впливом ЕЕТП 9 на 7-му добу спостереження число каріоцитів в КМ мишей із імунодепресією підвищувалося в динаміці та складало вже 74 % від нормальних значень у інтактних тварин. На 14-ту добу у мишей даної групи число каріоцитів не мало достовірної відмінності від групи інтактних мишей, тобто вже знаходилось на рівні інтактних тварин – $(3,65 \pm 0,27) \times 10^7$ й $(3,90 \pm 0,17) \times 10^7$, ($p \leq 0,05$). Коли у групи імунодепресованих мишей рівень ядерних клітин був в 1,6 раза меншим від нормального.

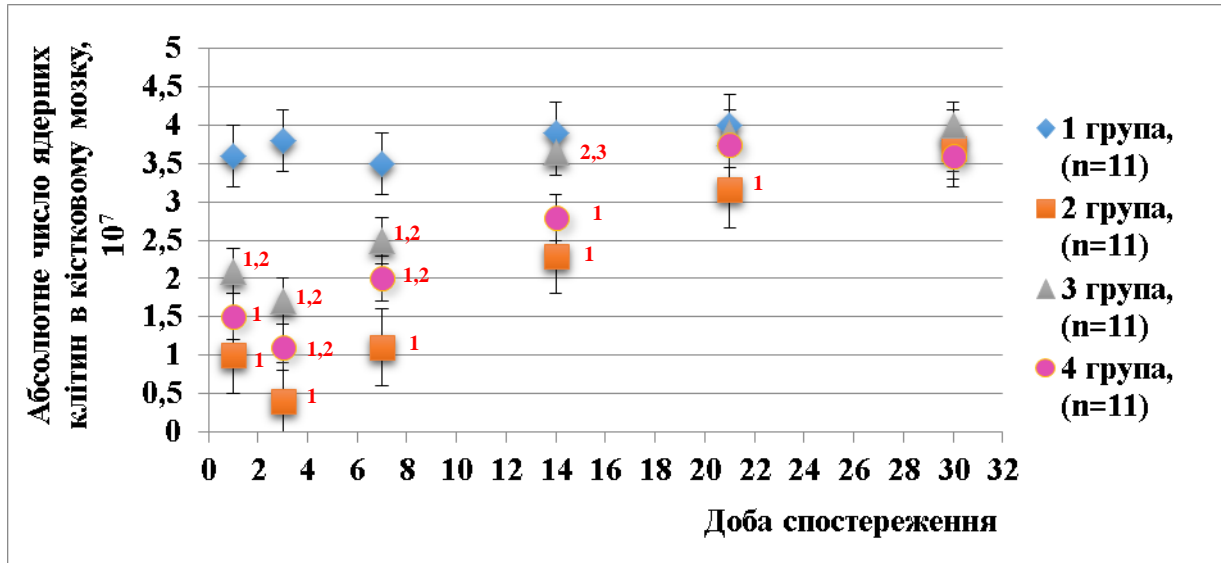


Рис. 4.1. Абсолютне число ядерних клітин в кістковому мозку мишей із радіаційною імунодепресією під впливом ЕЕТП 9: 1 група – інтактні тварини, (n=11); 2 група – тварини із імунодепресією, (n=11); 3 група – тварини із імунодепресією та застосуванням ЕЕТП 9, (n=11); 4 група – тварини із імунодепресією та застосуванням препарату порівняння, (n=11); ¹ – достовірно відносно інтактних тварин, $p \leq 0,05$; ² – достовірно відносно групи тварин із радіаційною імунодепресією, $p \leq 0,05$; ³ – достовірність відмінності даних відносно групи тварин із застосуванням препарату порівняння, $p \leq 0,05$

Застосування препарату порівняння на 14-ту добу спостереження, хоча і призвело до достовірного підвищення числа каріоцитів кісткового мозку в порівнянні з групою контролю – $(3,0 \pm 0,24) \times 10^7$ й $(2,42 \pm 0,18) \times 10^7$, ($p \leq 0,05$), але не досягало рівня каріоцитів у інтактних тварин – $(3,9 \pm 0,17) \times 10^7$. Відновлення до фізіологічного рівня числа мієлокаріоцитів у тварин цієї групи відбулося лише на 21-шу добу після індукції імунодепресії.

Переваги застосування ЕЕТП 9 також зареєстровано за дослідження динаміки відновлення кількості в кістковому мозку В-лімфоцитів різного ступеня зрілості – sm^+sm^- , sm^+ -клітин та Т-лімфоцитів з рецептором CD90.2^+ , що є відомим як Thy 1 .

Так, було встановлено, що застосування ЕЕТП 9 за вказаною схемою призводить до достовірно меншої втрати числа каріоцитів різного ступеня зрілості в кістковому мозку мишей, які були піддані дії індуктора імунодепресії.

На 3-тю добу спостереження відносне число sm^+ -клітин в КМ після застосування ЕЕТП 9 складала 64,2 % від рівня у інтактних тварин порівняно з 20,7 % у групи, що не отримувала будь-яких засобів. На дані строки спостереження відносна кількість цих клітин у тварин із імунодепресією, які отримували препарат порівняння складала 28,4 % від інтактних тварин.

Нормалізація відносного числа sm^+ -клітин у мишей із індукованою імунодепресією у разі застосування ЕЕТП 9 відбулася на 14-ту добу спостереження, в той час коли у мишей за дії препарату порівняння все ще спостерігалася достовірно нижча відносна кількість цих клітин порівняно з інтактними тваринами – $(22,51 \pm 2,53) \%$ та $(41,20 \pm 1,62) \%$ відповідно.

Число sm^+sm^- -клітин – більш зрілих В-лімфоцитів КМ – після застосування ЕЕТП 9 у мишей, що були піддані ушкоджуючому впливові, збереглося на 3-тю добу спостереження на рівні, що складав 65,4 % від інтактних тварин. В той же час за дії препарату порівняння цей показник склав лише 36 % від значень у інтактних тварин. Фізіологічного рівня відносне число sm^+sm^- -клітин в КМ тварин, які отримували ЕЕТП 9, досягло на 14-ту добу спостереження, коли у разі застосування препарату порівняння число цих клітин було достовірно меншим ніж у інтактних тварин $(17,40 \pm 1,86) \%$ та $(31,12 \pm 1,34) \%$, відповідно, ($p \leq 0,05$).

Таблиця 4.1

Відносне число CD90.2⁺, $\text{с}\mu^+\text{с}\mu^-$, $\text{с}\mu^+$ -клітин (%) у кісткового мозку мишей із імунодепресією під впливом ЕЕТП 9

Доба спостереження	Групи тварин	$\text{с}\mu^+$ -клітини	$\text{с}\mu^+\text{с}\mu^-$ -клітини	CD90.2 ⁺
3 доба	1 група	40,20±2,10	30,11±1,42	3,32±0,13
	2 група	8,34±0,76 ¹	5,21±0,48 ¹	1,95±0,10 ¹
	3 група	25,80±1,40 ^{1,2,3}	19,70±1,53 ^{1,2,3}	2,30±0,20 ^{1,2,3}
	4 група	11,40±1,02 ^{1,2}	10,84±1,01 ^{1,2}	1,89±0,13 ¹
7 доба	1 група	40,0±1,80	28,62±1,70	3,25±0,12
	2 група	10,23±1,09 ¹	6,24±0,45 ¹	1,03±0,14 ¹
	3 група	30,85±1,4 ^{1,2,3}	20,70±1,42 ^{1,2,3}	2,91±0,27 ²
	4 група	24,30±1,52 ^{1,2}	13,64±1,21 ^{1,2}	2,87±0,23 ²
14 доба	1 група	41,20±1,62	31,12±1,34	3,29±0,21
	2 група	16,29±1,34 ¹	7,31±0,60 ¹	1,58±0,30 ¹
	3 група	36,90±2,62 ^{2,3}	29,42±1,64 ^{2,3}	2,95±0,28 ²
	4 група	22,51±2,10 ^{1,2}	17,40±1,66 ^{1,2}	2,80±0,20 ²
21 доба	1 група	39,88±1,74	31,69±1,19	3,46±0,22
	2 група	18,22±1,17 ¹	8,91±0,20 ¹	1,56±0,21 ¹
	3 група	35,65±2,19 ²	28,23±1,86 ²	3,35±0,27 ²
	4 група	36,12±2,83 ²	31,41±2,17 ²	3,50±0,31 ²
31 доба	1 група	40,0±1,47	30,19±1,71	3,48±0,16
	2 група	35,60±3,01	27,58±2,71	2,41±0,22
	3 група	38,07±2,19	31,60±1,34	3,81±0,20
	4 група	39,19±2,53	28,60±1,89	3,63±0,24

1 група – інтактні тварини, (n=11); 2 група – тварини із імунодепресією, (n=11); 3 група – тварини із імунодепресією та застосуванням ЕЕТП 9; 4 група – тварини із імунодепресією та застосуванням препарату порівняння, (n=11).

¹ – достовірно відносно групи інтактних мишей, $p \leq 0,05$,

² – достовірно відносно групи мишей із радіаційною імунодепресією, $p \leq 0,05$;

³ – достовірно відносно групи тварин із радіаційною імунодепресією та застосуванням препарату порівняння, $p \leq 0,05$.

За дії ЕЕТП 9 у мишей із індукованою імунодепресією збереглася на 3-тю добу і значна частина незрілих Т-лімфоцитів з маркером CD90.2⁺. Так, у мишей даної групи їх відносний вміст склав 69,3 % від інтактних тварин, в той час, коли у мишей із застосуванням препарату порівняння відносний вміст цих клітин у КМ не мав достовірної різниці з відповідним контролем і був у 1,75 раза нижчим ніж у інтактних тварин. Однак, на 7-му добу спостерігалась нормалізація відносного числа CD90.2⁺-клітин у кістковому мозку тварин із імунодепресією як за дії препарату порівняння так і ЕЕТП 9.

Таким чином, застосування ЕЕТП 9 мишам дозволяє спостерігати значно менші диспропорції відносного вмісту В- та Т-лімфоцитів різного ступеня зрілості в кістковому мозку на ранніх етапах після впливу радіаційного фактора імунодепресії, а також дозволяє досягти в більш короткий термін повної нормалізації відносного числа В-лімфоцитів різного ступеня зрілості порівняно із застосуванням препарату порівняння. Відновлення фізіологічного рівня відносного числа CD90.2⁺-клітин у кістковому мозку тварин із імунодепресією за впливу ЕЕТП 9 та препарату порівняння відбувається синхронно на 7-му добу спостереження.

4.2 Відновлення абсолютного числа каріоцитів тимусу мишей із радіаційною імунодепресією під впливом ЕЕТП 9

Абсолютне число каріоцитів тимусу під впливом ЕЕТП 9 зазнавало найбільшого падіння на 5-ту добу після радіаційного впливу, при цьому удвічі перевищуючи цей показник у групі, яка отримувала препарат порівняння і майже вчетверо – у тварин, без застосування жодних препаратів (рис. 4.2).

Повна нормалізація загальної клітинності органу під дією ЕЕТП 9 відбувалася на 21-шу добу, не зазнаючи в процесі відновлення ніяких коливань.

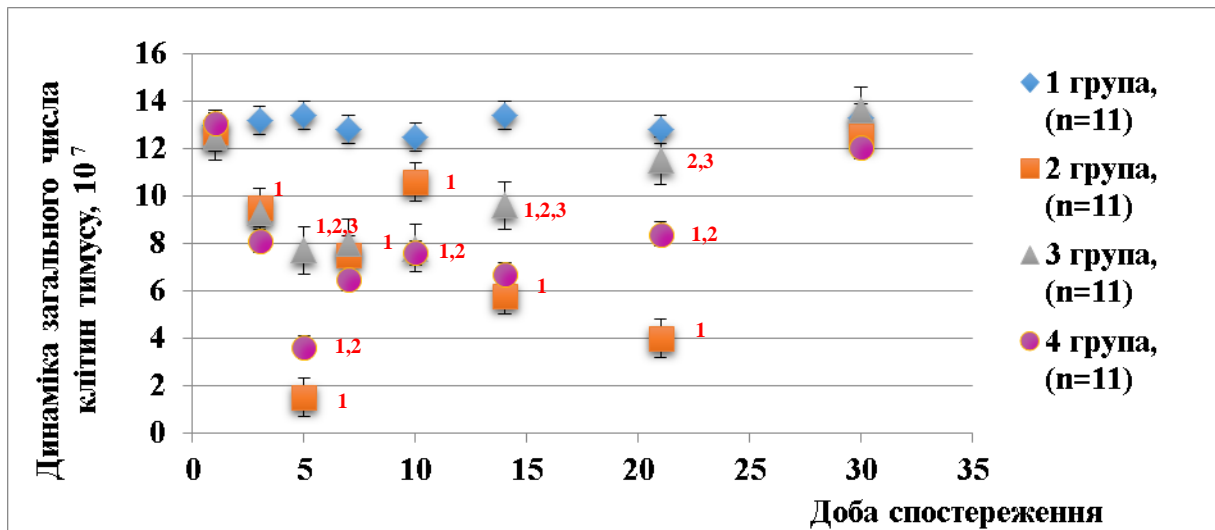


Рис. 4.2. Абсолютне число каріоцитів тимусу мишей із радіаційною імунодепресією під впливом ЕЕТП 9: 1 група – інтактні тварини; 2 група – тварини із імунодепресією; 3 група – тварини із імунодепресією та застосуванням ЕЕТП 9; 4 група – тварини із імунодепресією та застосуванням препарату порівняння, (n=11); ¹ – достовірно відносно групи інтактних тварин, $p \leq 0,05$; ² – достовірно відносно групи тварин із радіаційною імунодепресією, $p \leq 0,05$; ³ – достовірно відносно групи тварин із застосуванням препарату порівняння, $p \leq 0,05$

В той час, реконституція клітинності тимусу під впливом контрольного препарату мала хвилеподібний характер, демонструючи певне зниження на 14-ту добу, а відновлення до норми – на тиждень пізніше – лише на 30-ту добу дослідження.

4.3 Відновлення абсолютного числа каріоцитів селезінки мишей із радіаційною імунодепресією під впливом ЕЕТП 9

На 3-тю добу спостереження абсолютне число ядерних клітин селезінки мишей із імунодепресією у разі застосування ЕЕТП 9 складало 63 % числа інтактних тварин, коли у мишей із імунодепресією цей показник складав лише

29,6 %. В критичний момент найбільшого зниження клітинності селезінки, на 7-му добу, у мишей під впливом ЕЕТП 9 рівень цих клітин склав 55 % від норми, у групи же із застосування препарату порівняння – 34 % норми.

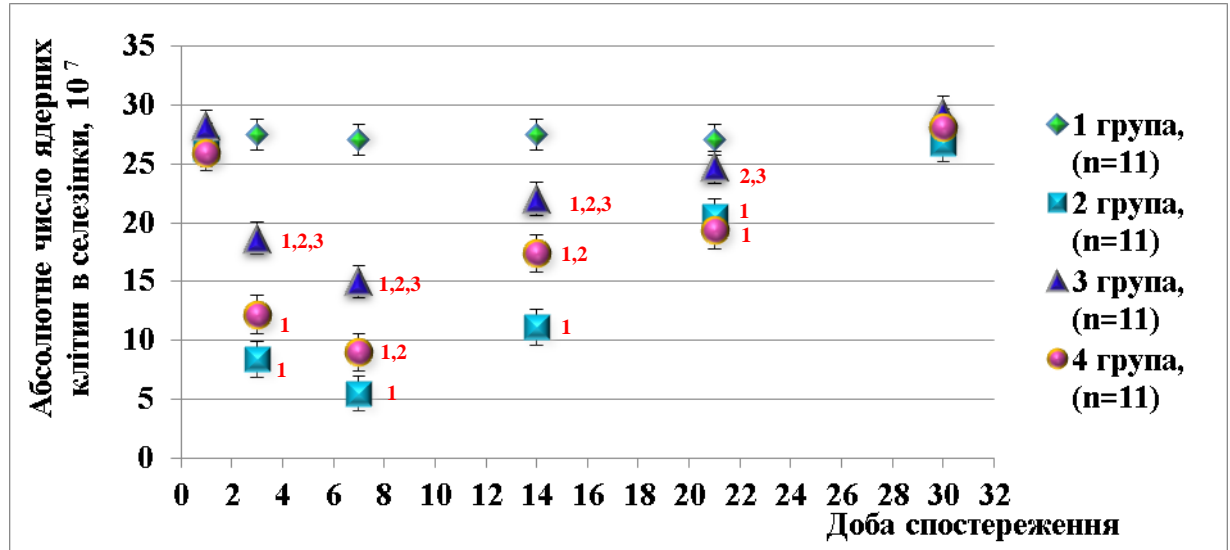


Рис. 4.3. Абсолютне число ядерних клітин селезінки мишей із радіаційною імунодепресією під впливом ЕЕТП 9: 1 група – інтактні тварини, (n=11); 2 група – тварини із імунодепресією, (n=11); 3 група – тварини із імунодепресією та застосуванням ЕЕТП 9, (n=11); 4 група – тварини із імунодепресією та застосуванням препарату порівняння, (n=11); ¹ – достовірно відносно групи інтактних тварин, $p \leq 0,05$; ² – достовірно відносно групи тварин із радіаційною імунодепресією, $p \leq 0,05$; ³ – достовірно відносно групи тварин із застосуванням препарату порівняння, $p \leq 0,05$

Повне відновлення загального числа каріоцитів селезінки під впливом ЕЕТП 9 відбулося на 21-шу добу, коли в групі із застосуванням препарату порівняння число цих клітин склало 75 % норми, що співпадало з числом клітин у мишей без застосування будь-яких засобів (рис. 4.3).

4.4 Стан периферичної крові під впливом ЕЕТП 9 мишам із радіаційною імунодепресією

Досліджено вплив внутрішньом'язового введення ЕЕТП 9 на динаміку абсолютного числа формених елементів периферичної крові та відносне число основних популяцій лімфоцитів мишей із радіаційною імунодепресією. Кількісна оцінка даних показників здійснювалася на 3-тю, 7-му, 14-ту, 21-шу й 31-шу добу після моделювання радіаційної імунодепресії.

Введення ЕЕТП 9 та препарату порівняння здоровим мишам не призвело до достовірних змін по відношенню до інтактних тварин в жодній точці спостереження (рис. 4.4).

За умови застосування ЕЕТП 9 у мишей із імунодепресією вже на 3-тю добу спостереження кількість лейкоцитів в периферичній крові, хоча і була майже в 2 рази нижчою від їх кількості у інтактних тварин – $(3,42 \pm 0,31) \times 10^9/\text{л}$ порівняно з $(6,30 \pm 0,30) \times 10^9/\text{л}$, але перевищувала (в 10,0 разів) рівень цього показника у тварин із імунодепресією без застосування ЕЕТП 9 – $(0,58 \pm 0,08) \times 10^9/\text{л}$. На 7-му добу число лейкоцитів було в 5 разів вище ніж у імунодепресованих мишей і становило 69,2 % від значень у інтактних тварин – $(4,30 \pm 0,05) \times 10^9/\text{л}$ проти $(0,86 \pm 0,07) \times 10^9/\text{л}$ відповідно, ($p \leq 0,05$). Число лейкоцитів у мишей із імунодепресією на 14-ту добу складало 29,9 % від значень у групи інтактних тварин, причому на 21-шу добу повного відновлення кількості цих клітин у периферичній крові імунодепресованих тварин так і не відбулось (58,3 % від значень у інтактних тварин), повне відновлення вдалося спостерігати лише на 31-шу добу. У мишей із імунодепресією у разі застосування ЕЕТП 9 число лейкоцитів вже на 14-ту добу фактично досягло рівня інтактних тварин – $(5,81 \pm 0,37) \times 10^9/\text{л}$ порівняно з $(6,38 \pm 0,22) \times 10^9/\text{л}$ відповідно.

У разі застосування препарату порівняння мишам із імунодепресією на 3-тю та 7-му добу спостереження кількість лейкоцитів також мала достовірну різницю зі значеннями цього показника у опромінених мишей. На 14-ту та 21-шу добу реєструвалося достовірне підвищення загального числа лейкоцитів у мишей

даної групи по відношенню до групи контролю в 2,5 разів – $(3,25 \pm 0,32) \times 10^9/\text{л}$ порівняно з $(1,91 \pm 0,37) \times 10^9/\text{л}$ на 14-ту добу та на 57 % – $(6,0 \pm 0,45) \times 10^9/\text{л}$ порівняно з $(3,8 \pm 0,33) \times 10^9/\text{л}$ на 21-шу добу, ($p \leq 0,05$). На відміну від застосування ЕЕТП 9, яке призводило до нормалізації числа лейкоцитів на 14-ту добу, під впливом препарату порівняння даний ефект можна було спостерігати лише на 21-шу добу після індукції імунодепресії, (рис. 4.4.).

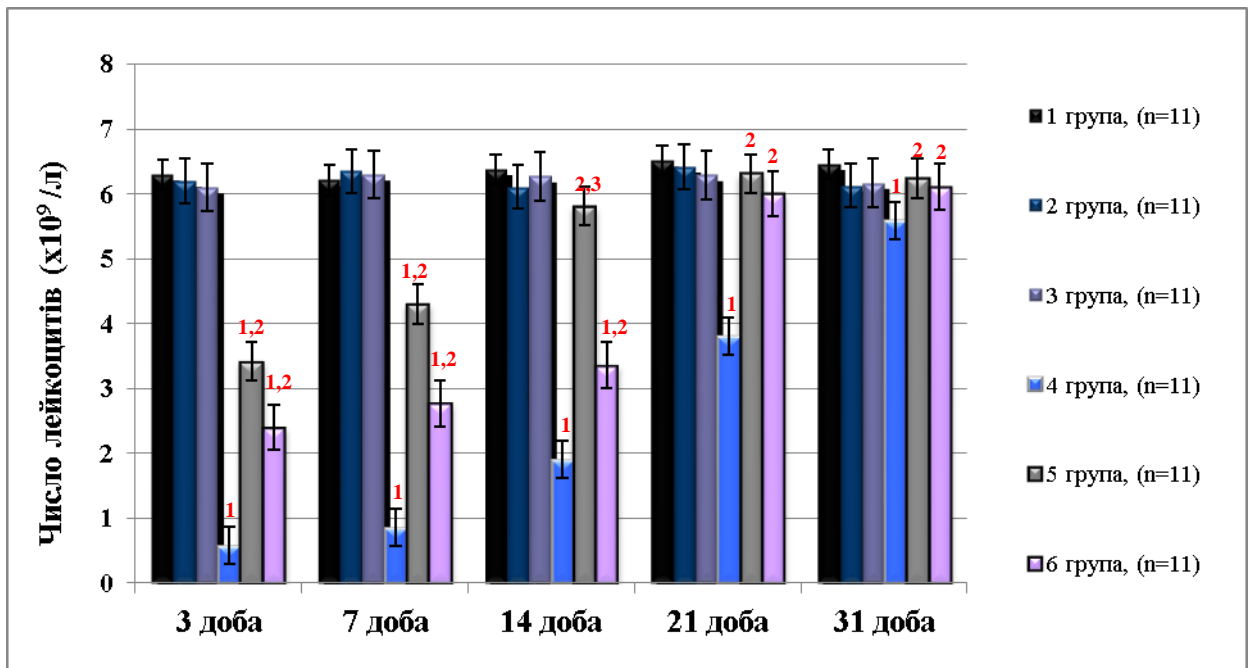


Рис. 4.4. Абсолютне число лейкоцитів в периферичній крові мишей із радіаційною імунодепресією під впливом ЕЕТП 9: 1 група – інтактні тварини, (n=11); 2 група – тварини із застосуванням ЕЕТП 9, (n=11); 3 група – тварини із застосуванням препарату порівняння, (n=11); 4 група – тварини із імунодепресією, (n=11); 5 група – тварини із імунодепресією та застосуванням ЕЕТП 9, (n=11); 6 група – тварини із імунодепресією та застосуванням препарату порівняння, (n=11); ¹ – достовірно відносно інтактних тварин, $p \leq 0,05$; ² – достовірно відносно групи тварин із радіаційною імунодепресією, $p \leq 0,05$; ³ – достовірно відносно групи тварин із застосуванням препарату порівняння, $p \leq 0,05$

Отже, у разі застосування ЕЕТП 9 мишам із радіаційною імунодепресією, спостерігається більш рання нормалізація кількості лейкоцитів. І вже на 14-ту

добу дослідження реєструються їх фізіологічні рівні у периферичній крові, чого не відбувається без застосування екстракту у тварин із імунодепресією, у яких рівень цих клітин нормалізувався лише на 31-шу добу експерименту. Порівнянно з контрольним препаратом застосування ЕЕТП 9 сприяє нормалізації числа лейкоцитів в значно коротший термін.

Достовірне зниження абсолютного числа еритроцитів у мишей із радіаційною імунодепресією реєстрували на 7-му добу спостереження, коли їх рівень склав 52,7 % від інтактних тварин. Під впливом ЕЕТП 9 число еритроцитів у мишей із імунодепресією на 7-му добу було дещо вищим, ніж у мишей, яким його не вводили – $(3,90 \pm 0,20) \times 10^{12}/\text{л}$ й $(2,90 \pm 0,17) \times 10^{12}/\text{л}$ відповідно, ($p \leq 0,05$), і складало 71 % від норми. На 14-ту добу спостереження зафіксовано більш виражене зниження числа еритроцитів мишей із імунодепресією – $(2,0 \pm 0,22) \times 10^{12}/\text{л}$ й $(5,61 \pm 0,17) \times 10^{12}/\text{л}$ в групі інтактних тварин, у той час, коли під впливом ЕЕТП 9 у мишей із радіаційною імунодепресією рівень цього показника склав 87,5 % від значень у інтактних тварин, (рис. 4.5.).

На 21-шу добу за дії ЕЕТП 9 рівень еритроцитів у імунодепресованих тварин досяг значень у інтактних мишей, в той час, коли у дослідної групи без застосування ЕЕТП 9 рівень цього показника складав 62,5 % від інтактних тварин, (рис. 4.5). За умов застосування препарату порівняння також були зафіксовані більш висока кількість еритроцитів ніж у групи контролю, ($p \leq 0,05$). Однак, на 7-му та 14-ту добу все ж таки реєструвалася достовірна різниця у рівнях даного показника після застосування ЕЕТП 9 та препарату порівняння – $(3,90 \pm 0,20) \times 10^{12}/\text{л}$ й $(5,40 \pm 0,26) \times 10^{12}/\text{л}$ проти $(3,22 \pm 0,34) \times 10^{12}/\text{л}$ та $(4,31 \pm 0,29) \times 10^{12}/\text{л}$, відповідно, ($p \leq 0,05$).

За застосування «Ербісолу» на відміну від ЕЕТП 9 достовірного підвищення числа еритроцитів порівняно з тваринами із імунодепресією на 7-му добу не спостерігалось. Підвищення числа еритроцитів у даної групи тварин реєструвалося з 14-ої доби спостереження, але воно було не таким значним як під дією ЕЕТП 9. Крім того, на 21-шу добу на відміну від групи, тварини якої отримували ЕЕТП 9, у мишей із застосуванням препарату порівняння повного

відновлення числа еритроцитів у периферичній крові за означений термін експерименту досягти не вдалося.

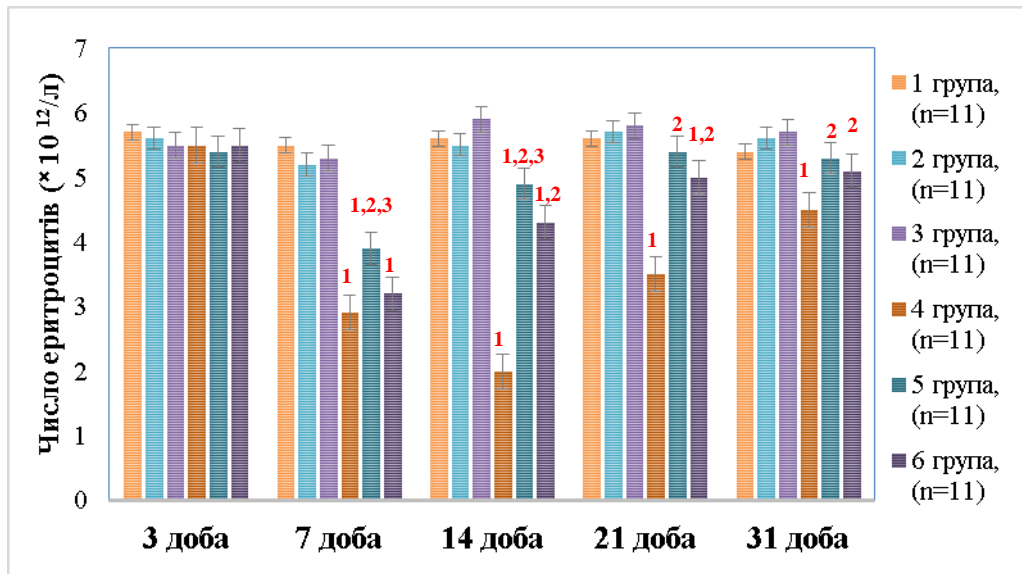


Рис. 4.5. Абсолютне число еритроцитів периферичної крові мишей із радіаційною імунодепресією під впливом ЕЕТП 9: 1 група – інтактні тварини, (n=11); 2 група – тварини із застосуванням ЕЕТП 9, (n=11); 3 група – тварини із застосуванням препарату порівняння, (n=11); 4 група – тварини із імунодепресією, (n=11); 5 група – тварини із імунодепресією та застосуванням ЕЕТП 9, (n=11); 6 група – тварини із імунодепресією та застосуванням препарату порівняння, (n=11); ¹ – достовірно відносно інтактних тварин, $p \leq 0,05$; ² – достовірно відносно групи тварин із радіаційною імунодепресією, $p \leq 0,05$; ³ – достовірно відносно групи тварин із застосуванням препарату порівняння, $p \leq 0,05$

Таким чином, під впливом екстракту з ембріональних тканин птахів число еритроцитів не знижувалось нижче $(3,9 \pm 0,2) \times 10^{12}/л$, а з 14-ої доби реєструвалися нормальні їх значення. Під впливом препарату порівняння повне відновлення числа еритроцитів реєстрували на 31-шу добу, коли спостерігалася хоча і мінімальна, але достовірна різниця у рівнях досліджуваного показника із значеннями контрольної групи тварин без застосування будь-яких засобів.

Під час дослідження абсолютної кількості гранулоцитів (паличко- й сегментоядерних нейтрофілів, еозинофілів, базофілів сумарно) в периферичній

крові мишей із імунодепресією, їх число на 3-тю добу спостереження становило 14,7 % від значення у інтактних тварин, ($p \leq 0,05$). За застосування ЕЕТП 9 цей показник складав 44,2 % від інтактних тварин. На 7-му добу після ушкоджуючого впливу відбулося ще значніше зниження числа гранулоцитів по відношенню до інтактних тварин – (11 % від рівня у інтактних тварин). Однак, застосування екстракту посприяло достовірному підвищенню абсолютного числа цих формених елементів по відношенню до контрольної групи без застосування ЕЕТП 9, яке склало 68,75 % рівня у інтактних тварин, ($p \leq 0,05$), (рис. 4.6).

На 14-ту добу після ушкоджуючого впливу зафіксовано деяке відновлення рівня гранулоцитів – $(1,14 \pm 0,13) \times 10^9/\text{л}$ порівняно з 7-ою добою $(0,28 \pm 0,017) \times 10^9/\text{л}$, ($p \leq 0,05$), однак зниження все ще було суттєвим порівняно зі значеннями у інтактних тварин (60 % рівня у інтактних тварин). Знижене число гранулоцитів у контрольної групи було визначено й на 21-шу добу – $(1,57 \pm 0,25) \times 10^9/\text{л}$ порівняно з інтактними тваринами $(2,10 \pm 0,14) \times 10^9/\text{л}$, ($p \leq 0,05$). У мишей, яким вводили ЕЕТП 9 на 14-ту добу рівень гранулоцитів був вже в межах норми – $(2,1 \pm 0,2) \times 10^9/\text{л}$ порівняно з $(1,9 \pm 0,13) \times 10^9/\text{л}$, відповідно.

За застосування «Ербісол» на відміну від ЕЕТП 9 відновлення числа гранулоцитів у мишей із радіаційною імунодепресією відбулося на 21-шу добу спостереження.

Таким чином, під впливом ЕЕТП 9 ми спостерігали прискорення відновлення абсолютного числа гранулоцитів в периферичній крові тварин із імунодепресією із досягненням фізіологічних рівнів вже на 14-ту добу спостереження, в той час коли у тварин групи контролю нормалізація не відбувалася і на 31-шу добу. Під впливом препарату порівняння відновлення можна було спостерігати на 21-шу добу експерименту.

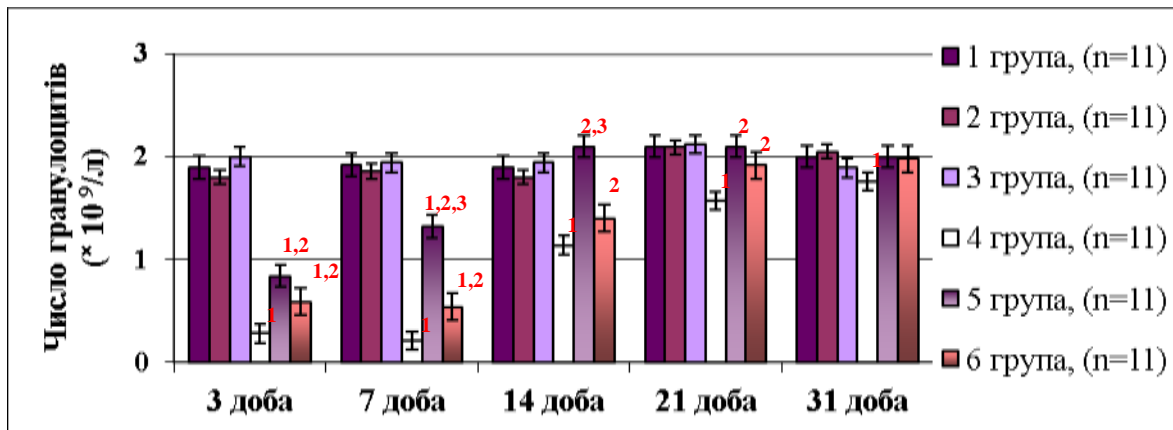


Рис. 4.6. Абсолютне число гранулоцитів периферичної крові мишей із радіаційною імунодепресією під впливом ЕЕТП 9: 1 група – інтактні тварини, (n=11); 2 група – тварини із застосуванням ЕЕТП 9, (n=11); 3 група – тварини із застосуванням препарату порівняння, (n=11); 4 група – тварини із імунодепресією, (n=11); 5 група – тварини із імунодепресією та застосуванням ЕЕТП 9, (n=11); 6 група – тварини із імунодепресією та застосуванням препарату порівняння, (n=11); ¹ – достовірно відносно інтактних тварин, $p \leq 0,05$; ² – достовірно відносно групи тварин із радіаційною імунодепресією, $p \leq 0,05$; ³ – достовірно відносно групи тварин із застосуванням препарату порівняння, $p \leq 0,05$

Рівень тромбоцитів у тварин знизився на 7-му добу спостереження в 2,7 раза – $(150,0 \pm 13,7) \times 10^9/\text{л}$ порівняно з інтактними тваринами $(411,0 \pm 29,0) \times 10^9/\text{л}$, ($p \leq 0,05$). Під впливом ЕЕТП 9 у тварин із імунодепресією їх абсолютне число було нижчим порівнянно з інтактними тваринами в 1,7 раза (рис. 4.7). За умови введення «Ербісол» мишам із променевою імунодепресією достовірної різниці у числі тромбоцитів із групою опромінених мишей, яким його не застосовували зареєстровано на 7-му добу не було.

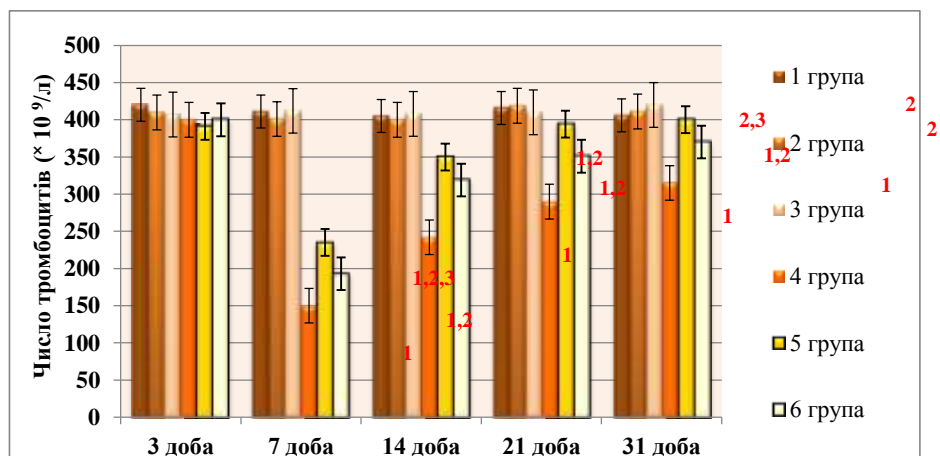


Рис. 4.7. Абсолютне число тромбоцитів периферичної крові мишей із радіаційною імунодепресією під впливом ЕЕТП 9: 1 група – інтактні тварини, (n=11); 2 група – тварини із застосуванням ЕЕТП 9, (n=11); 3 група – тварини із застосуванням препарату порівняння, (n=11); 4 група – тварини із імунодепресією, (n=11); 5 група – тварини із імунодепресією та застосуванням ЕЕТП 9, (n=11); 6 група – тварини із імунодепресією та застосуванням препарату порівняння, (n=11); ¹ – достовірно відносно інтактних тварин, $p \leq 0,05$; ² – достовірно відносно групи тварин із радіаційною імунодепресією, $p \leq 0,05$; ³ – достовірно відносно групи тварин із застосуванням препарату порівняння, $p \leq 0,05$

На 14-ту добу спостереження число тромбоцитів у тварин із імунодепресією склало 59,7 % рівня у інтактних тварин – $(242,0 \pm 28,0) \times 10^9/\text{л}$ й $(405,0 \pm 34,0) \times 10^9/\text{л}$, відповідно. Застосування ЕЕТП 9 призвело до достовірного збільшення числа тромбоцитів порівняно з тваринами, які його не отримували – $(350,0 \pm 32,4) \times 10^9/\text{л}$ порівняно з $(242,0 \pm 28,0) \times 10^9/\text{л}$, відповідно, ($p \leq 0,05$). На 14-ту добу їх рівень склав 86,4 % рівня у інтактних тварин.

На 21-шу добу зареєстровано нормалізацію абсолютного числа тромбоцитів у тварин цієї групи, в той час коли у мишей без застосування ЕЕТП 9 рівень цих формених елементів периферичної крові складав 69,7 % від значень у інтактних

тварин. Під впливом препарату порівняння число тромбоцитів у мишей із радіаційною імунодепресією ледь перевищувало значення у тварин контрольної групи.

Таким чином, у мишей із радіаційною імунодепресією на ранніх етапах спостереження, а саме на 3-тю добу, відзначено виражену лейкопенію, що деякою мірою зберігалась до 21-ої доби після променевого ушкодження. Зниження кількості еритроцитів відбувалося повільніше, максимум якого припадав на 14-ту добу після ушкоджуючого впливу. Також відзначено швидке зниження кількості гранулоцитів крові (нейтрофілів, базофілів, еозинофілів), коли вже на 3-тю добу їх рівень в периферичній крові був нижчим в 6,5 раза порівняно з рівнем у інтактних тварин. Кількість тромбоцитів значно знизилась на 7-му добу після опромінення, тоді ж їх рівень був мінімальним в динаміці спостереження.

Достовірне підвищення кількості лейкоцитів у тварин, яким вводили ЕЕТП 9, відбувалося вже на 7-му добу спостереження, причому їх значення було в 3,0 рази вищим, ніж у тварин в період «розпалу» променевої імунодепресії. В 2,0 рази вищою була чисельність еритроцитів у мишей із імунодепресією на тлі застосування ЕЕТП 9 в ці строки. Число лейкоцитів і еритроцитів периферичної крові досягло нормальних значень під впливом ЕЕТП 9 на 14-ту добу спостереження, повна ж нормалізація числа тромбоцитів – на 21-шу добу експерименту. Таким чином, за достовірними змінами абсолютного числа усіх формених елементів периферичної крові у мишей із радіаційною імунодепресією під впливом ЕЕТП 9 можна зробити висновок про його здатність відновлювати число клітин циркуляторного русла, що свідчить про сприяння нормалізації процесів гемопоезу. Біологічний ефект, що виник, можливо пов'язати зі створенням умов на тлі застосування ЕЕТП 9 для прискорення регенеративних процесів в червоному кістковому мозку. Застосування препарату порівняння призводило до бажаних ефектів, а саме до відновлення числа формених елементів периферичної крові у мишей із радіаційною імунодепресією в середньому на 7 діб пізніше від строку відновлення, що реєструвався під дією ЕЕТП 9 [176].

4.5 Відновлення числа лімфоцитів та їх субпопуляцій в периферичній крові мишей із радіаційною імунодепресією під впливом ЕЕТП 9

Значною мірою зниження числа лейкоцитів периферичної крові за умови радіаційної імунодепресії відбувається за рахунок зниження числа лімфоцитів.

Під впливом ЕЕТП 9 у мишей із радіаційною імунодепресією вже з 3-ої доби спостереження реєструвалося менш виражене зниження абсолютного числа лімфоцитів периферичної крові, число яких становило 33,6 % від норми, порівняно з групою контролю без його застосування – 8,8 % від норми. Під впливом препарату порівняння абсолютне число лімфоцитів на 3-тю добу було на рівні значень у тварин із імунодепресією.

На 7-му добу у тварин із імунодепресією на тлі введення ЕЕТП 9 відбулося підвищення абсолютного числа лімфоцитів в динаміці, яке склало 47,7 % нормального рівня, коли у тварин із радіаційною імунодепресією воно становило 10,9 % норми, а у тварин із введенням препарату порівняння – 27 %.

На 14-ту добу від індукції радіаційної імунодепресії у тварин із застосуванням ЕЕТП 9 було зафіксовано відновлення абсолютної кількості лімфоцитів периферичної крові до рівня у інтактних тварин. В цей час у тварин контрольної групи рівень цих клітин складав 14,3 % норми, а у тварин із застосуванням препарату порівняння – 40,1 % (рис. 4.8).

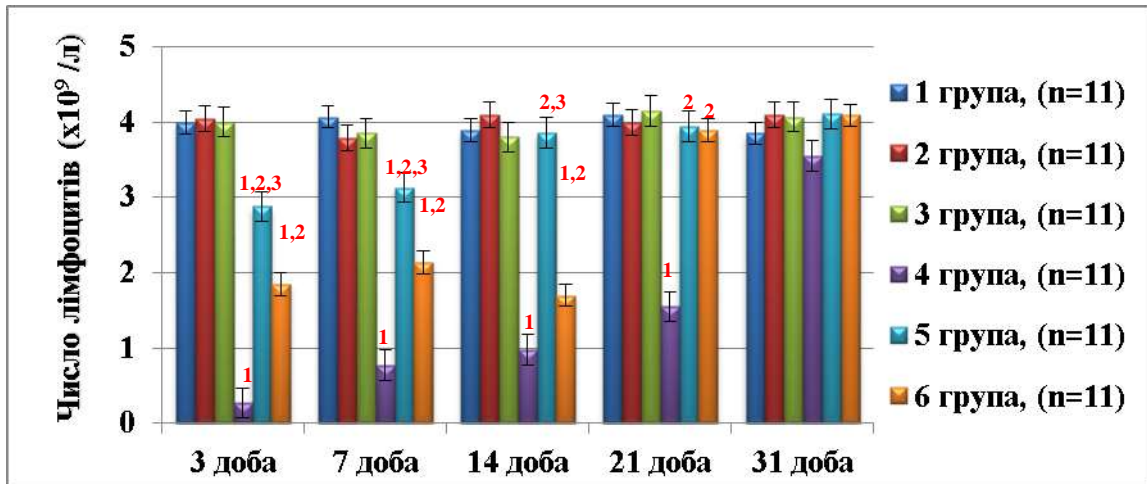


Рис. 4.8. Абсолютне число лімфоцитів периферичної крові мишей із радіаційною імунодепресією під впливом ЕЕТП 9: 1 група – інтактні тварини, (n=11); 2 група – тварини із застосуванням ЕЕТП 9, (n=11); 3 група – тварини із застосуванням препарату порівняння, (n=11); 4 група – тварини із імунодепресією, (n=11); 5 група – тварини із імунодепресією та застосуванням ЕЕТП 9, (n=11); 6 група – тварини із імунодепресією та застосуванням препарату порівняння, (n=11); ¹ – достовірно відносно інтактних тварин, $p \leq 0,05$; ² – достовірно відносно групи тварин із радіаційною імунодепресією, $p \leq 0,05$; ³ – достовірно відносно групи тварин із застосуванням препарату порівняння, $p \leq 0,05$

Таким чином, ЕЕТП 9 в умовах імунодепресії сприяє більш швидкому (на 14-ту добу) відновленню абсолютного числа лімфоцитів периферичної крові, коли подібний ефект у тварин із променевою імунодепресією було відмічено лише на 31-шу добу після ушкодження, а у разі застосування препарату порівняння – на 21-шу добу.

У мишей із імунодепресією було відзначено достовірне підвищення відносного числа $CD3^+$ на 3-тю добу в 1,3 раза, на 7-му – в 1,4 раза. Відсоток $CD45R^+/B220^+$ зазнав зниження в 4,6 разів на 3-тю добу порівняно з рівнями цих у інтактних тварин, в 3,7 раза – на 7-му і в 2,0 рази – на 14-ту добу спостереження (рис. 4.9 та 4.10).

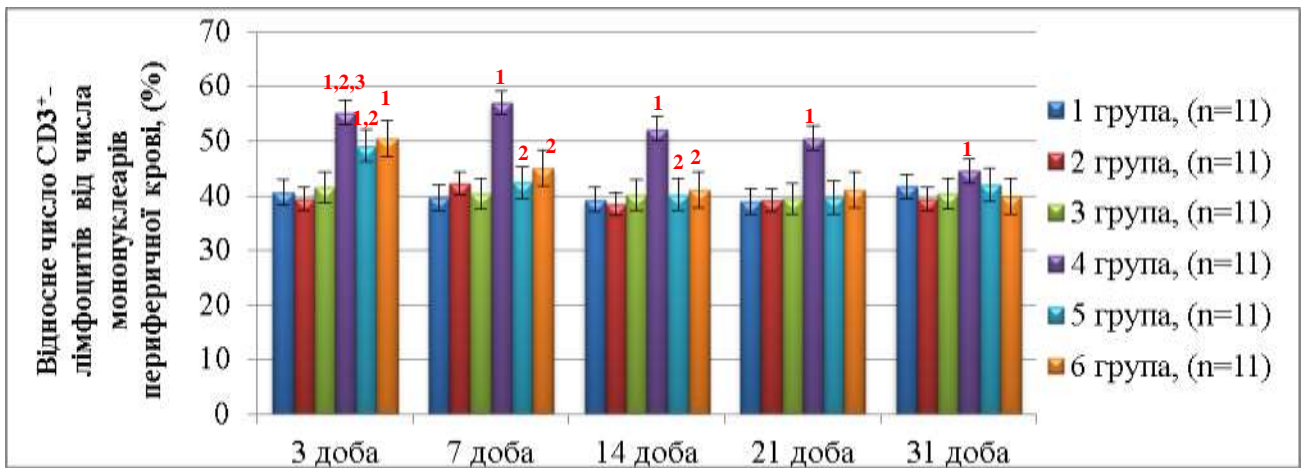


Рис. 4.9. Відносне число $CD3^+$ -лімфоцитів в периферичній крові мишей із радіаційною імунодепресією під впливом ЕЕТП 9: 1 група – інтактні тварини, (n=11); 2 група – тварини із застосуванням ЕЕТП 9, (n=11); 3 група – тварини із застосуванням препарату порівняння, (n=11); 4 група – тварини із імунодепресією, (n=11); 5 група – тварини із імунодепресією та застосуванням ЕЕТП 9, (n=11); 6 група – тварини із імунодепресією та застосуванням препарату порівняння, (n=11); ¹ – достовірно відносно інтактних тварин, $p \leq 0,05$; ² – достовірно відносно групи тварин із радіаційною імунодепресією, $p \leq 0,05$; ³ – достовірність відмінності даних відносно групи тварин із застосуванням препарату порівняння, $p \leq 0,05$

Відсоток $CD8^+$ -лімфоцитів від загального числа мононуклеарів периферичної крові знизився на 3-тю добу в 1,6 раза порівняно зі значеннями у інтактних тварин (рис. 4.9), коли достовірної різниці в ці строки спостереження у відносному числі $CD4^+$ -лімфоцитів порівняно з інтактними тваринами ще зареєстровано не було. Загалом динаміка відносної кількості $CD8^+$ -лімфоцитів у тварин із імунодепресією мала хвилеподібний характер.

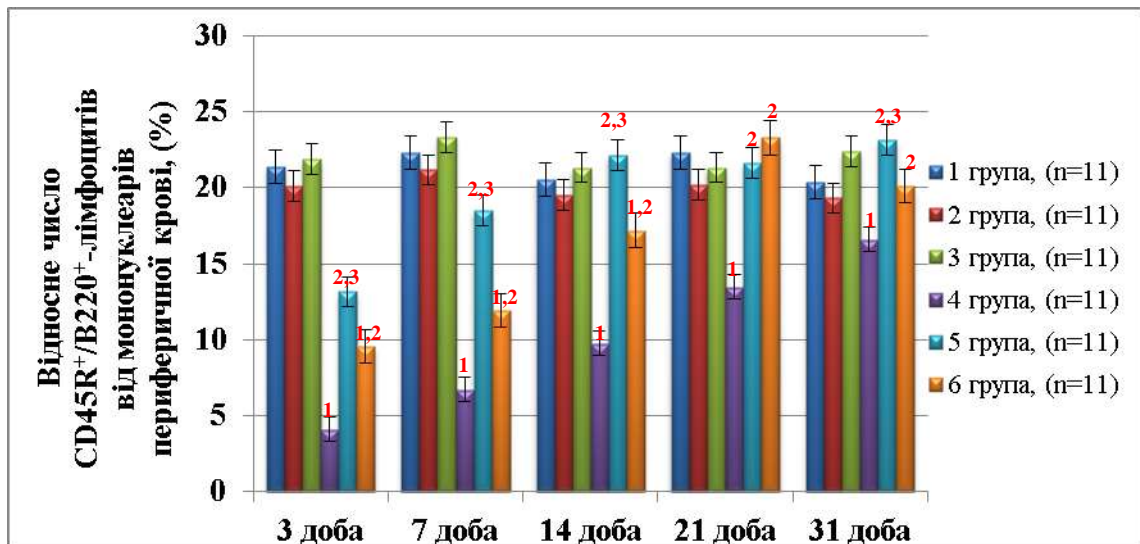


Рис. 4.10. Відносне число CD45R⁺/B220⁺-лімфоцитів в периферичній крові мишей із радіаційною імунодепресією під впливом ЕЕТП 9: 1 група – інтактні тварини, (n=11); 2 група – тварини із застосуванням ЕЕТП 9, (n=11); 3 група – тварини із застосуванням препарату порівняння, (n=11); 4 група – тварини із імунодепресією, (n=11); 5 група – тварини із імунодепресією та застосуванням ЕЕТП 9, (n=11); 6 група – тварини із імунодепресією та застосуванням препарату порівняння, (n=11); ¹ – достовірно відносно інтактних тварин, $p \leq 0,05$; ² – достовірно відносно групи тварин із радіаційною імунодепресією, $p \leq 0,05$; ³ – достовірно відносно групи тварин із застосуванням препарату порівняння, $p \leq 0,05$

Достовірно підвищення відносного числа CD4⁺-лімфоцитів спостерігалось на 7-му та 14-ту добу спостереження. На 3-тю та 14-ту добу зареєстрували достовірне зниження кількості CD8⁺-лімфоцитів.

Під впливом ЕЕТП 9 у мишей із радіаційною імунодепресією на 3-тю добу підвищення відносного числа CD3⁺-лімфоцитів хоча і було достовірним по відношенню до інтактних тварин, але ж не таким як у мишей групи контролю (підвищення в 1,5 раза).

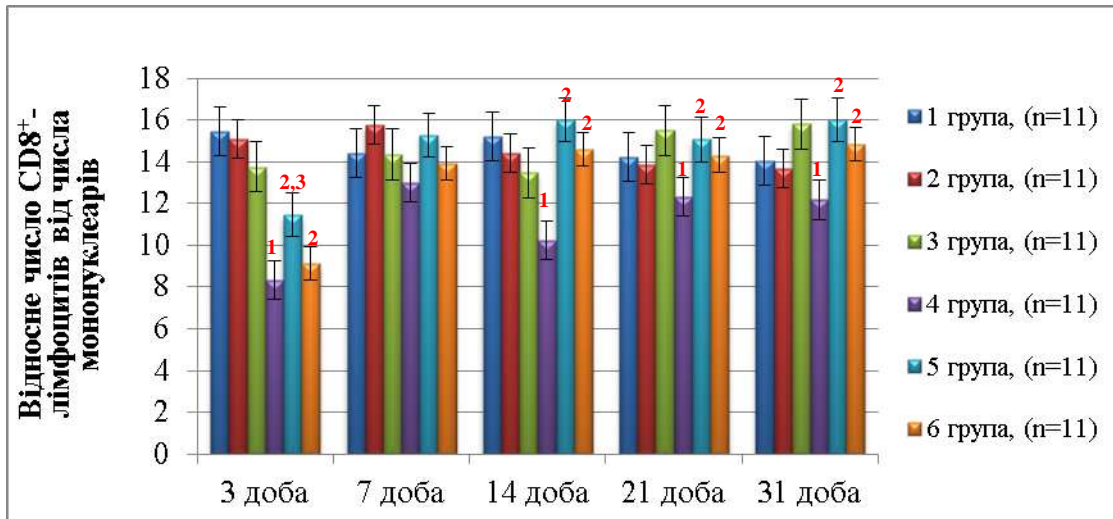


Рис. 4.11. Відносне число $CD8^+$ -лімфоцитів в периферичній крові мишей із радіаційною імунодепресією під впливом ЕЕТП 9: 1 група – інтактні тварини, (n=11); 2 група – тварини із застосуванням ЕЕТП 9, (n=11); 3 група – тварини із застосуванням препарату порівняння, (n=11); 4 група – тварини із імунодепресією, (n=11); 5 група – тварини із імунодепресією та застосуванням ЕЕТП 9, (n=11); 6 група – тварини із імунодепресією та застосуванням препарату порівняння, (n=11); ¹ – достовірно відносно інтактних тварин, $p \leq 0,05$; ² – достовірно відносно групи тварин із радіаційною імунодепресією, $p \leq 0,05$; ³ – достовірно відносно групи тварин із застосуванням препарату порівняння, $p \leq 0,05$

На 7-му добу зміни у відносному числі $CD3^+$ у мишей із радіаційною імунодепресією на тлі застосування ЕЕТП 9 не були достовірними по відношенню до інтактних тварин, тобто знаходились на рівні норми.

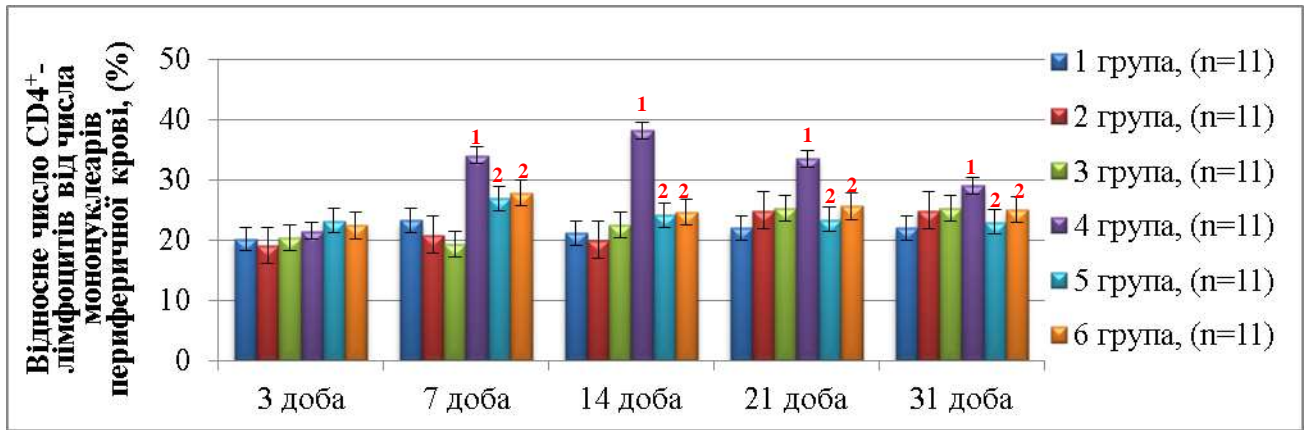


Рис. 4.12. Відносне число $CD4^+$ -лімфоцитів в периферичній крові мишей із радіаційною імунодепресією під впливом ЕЕТП 9: 1 група – інтактні тварини, (n=11); 2 група – тварини із застосуванням ЕЕТП 9, (n=11); 3 група – тварини із застосуванням препарату порівняння, (n=11); 4 група – тварини із імунодепресією, (n=11); 5 група – тварини із імунодепресією та застосуванням ЕЕТП 9, (n=11); 6 група – тварини із імунодепресією та застосуванням препарату порівняння, (n=11); ¹ – достовірно відносно інтактних тварин, $p \leq 0,05$; ² – достовірно відносно групи тварин із радіаційною імунодепресією, $p \leq 0,05$; ³ – достовірно відносно групи тварин із застосуванням препарату порівняння, $p \leq 0,05$

Під впливом ЕЕТП 9 зниження відносного вмісту $CD45R/B220$ також було не таким суттєвим, як у імунодепресованих тварин – в 1,7 раза порівняно з 4,3 раза на 3-тю добу. На 14-ту добу відносний рівень цих клітин за застосування ЕЕТП 9 досяг нормальних значень у інтактних тварин, чого не відбувалося у тварин із радіаційною імунодепресією та препарату порівняння.

Також за дії ЕЕТП 9 ми спостерігали значно швидшу нормалізацію відносного числа субпопуляцій Т-лімфоцитів $CD4^+$ та $CD8^+$, (рис. 4.11, 4.12). Так, у мишей даної групи спостерігалось на 3-тю добу лише незначне зниження відносної кількості $CD8^+$ -клітин порівняно зі значеннями у інтактних тварин. Відносне число $CD4^+$ з 7-ої доби спостереження не відрізнялося від їх рівня у

інтактних тварин, у разі застосування препарату порівняння було досягнуто цей ефект в ці ж строки.

Яскраво вираженою відмінністю у ефектах від застосування ЕЕТП 9 та препарату порівняння є дещо нижча здатність останнього до підтримки відносного числа CD45R/B220-лімфоцитів на нормальному рівні за умови опромінення тварин. Так, у мишей із імунодепресією, яким застосовували препарат порівняння відносна кількість цих клітин була достовірно нижчою на 3-тю, 7-му та 14-ту добу спостереження ніж за застосування ЕЕТП 9, а отже і в значнішій мірі відрізнялася від значень у інтактних тварин – зниження за введення препарату порівняння відносного числа цих клітин в 2,0 рази по відношенню до інтактних тварин, за введення ЕЕТП 9 – в 1,6 рази. Подібна тенденція зберігається і на 7-му, і на 14-ту добу спостереження.

РОЗДІЛ 5
РІВНІ ЦИТОКІНІВ, РЕГУЛЯТОРІВ ГЕМОПОЕЗУ ТА ІМУНОГЕНЕЗУ,
У МИШЕЙ ІЗ РАДІАЦІЙНОЮ ІМУНОДЕПРЕСІЄЮ ПІД ВПЛИВОМ
ЕЕТП 9

5.1 Вміст цитокінів в супернатанті культивованих *in vitro* каріоцитів кісткового мозку мишей із радіаційною імунодепресією під впливом ЕЕТП 9

Виходячи із відомостей про роль деяких цитокінів – продуктів функціональної активності клітинних елементів ГІМ – у процесі гемопоезу, дослідження динаміки їх рівня в супернатанті культивованих каріоцитів кісткового мозку дозволяє охарактеризувати стан радіаційно-індукованого ушкодження кровотворення на регуляторному рівні. Контроль вмісту саме таких гемопоетичних факторів як Flt3-ligand, IL-6 та G-CSF пропонується низкою авторів у якості біомаркерів порушення гемопоезу, зокрема, за умови радіаційного впливу [177, 178].

В експерименті встановлено, що гемопоез у здорових мишей характеризувався невисоким рівнем продукції G-CSF та IL-6 в кістковому мозку без коливань та стрибкоподібних змін у динаміці 21-єї доби спостереження, (табл. 5.1 – 5.3). Концентрація ж Flt3-ligand навпаки була низькою.

За введення ЕЕТП 9 здоровим тваринам відбулася транзиторна стимуляція утворення G-CSF у кістковому мозку, що виражалася в підвищенні його концентрації в період з 12-ої по 24-год після останнього введення досліджуваної субстанції. Пік концентрації в динаміці 1-ої доби спостереження припав на 20-ту год, перевищуюючи значення у інтактних тварин на відповідну годину спостереження в 7,5 рази. За застосування препарату порівняння було зареєстровано також достовірне, але не таке незначне підвищення вмісту G-CSF на 16-ту год після останнього введення ($6,79 \pm 0,59$) пг/мл порівняно з ($4,56 \pm 0,32$) пг/мл у групи інтактних тварин на відповідну годину спостереження.

Підвищений рівень ІЛ-6 під впливом ЕЕТП 9 у здорових мишей реєструється з 1-ої по 24-ту год після останнього введення з піком вмісту, коли перевищення порівняно з інтактними тваринами було в 6 разів, припадав на 16-ту годину. Після досягнення пікового значення відбувалася поступова нормалізація вмісту ІЛ-6 і на наступну часову точку реєстрації (3-тя доба) достовірних відмінностей від інтактних тварин вже не спостерігалось. Підвищення рівня Flt3-ligand в супернатанті культивованих клітин КМ під впливом досліджуваного екстракту не відбувалося. Подібна картина розгорталася і під впливом препарату порівняння.

Таблиця 5.1

**Вміст G-CSF в супернатанті ККМ, культивованих *in vitro*, у мишей із імунодепресією під впливом ЕЕТП 9
(пг/мл; M±m; n=11)**

Групи тварин	G-CSF (пг/мл)											
	1 год	3 год	6 год	9 год	12 год	16 год	20 год	24 год	3 доба	7 доба	14 доба	21 доба
1 група	4,42± 0,27	4,47± 0,31	5,08± 0,36	5,13± 0,28	5,20± 0,21	4,56± 0,32	5,22± 0,36	5,04± 0,22	5,0± 0,34	5,11± 0,30	5,13± 0,28	4,83± 0,28
2 група	5,92± 0,47	6,70± 0,54	5,72± 0,49	7,06± 0,66	14,92± 1,01 ¹	24,04± 2,12 ¹	38,88± 3,07 ¹	20,37± 2,01 ¹	4,70± 0,42	5,72± 0,39	5,06± 0,45	5,12± 0,46
3 група	5,73± 0,32	5,21± 0,24	4,39± 0,35	6,23± 0,62	3,48± 0,29	6,79± 0,59 ¹	6,92± 0,67 ¹	7,12± 0,64 ¹	4,21± 0,40	4,38± 0,36	5,01± 0,24	4,63± 0,31
4 група	154,0± 14,16 ¹	229,06± 21,30 ¹	877,20± 56,12 ¹	1024,18± 51,09 ¹	632,14± 43,08 ¹	413,0± 36,22 ¹	208,18± 19,17 ¹	116,19± 9,17 ¹	≤0,5	≤0,5	≤0,5	2,41± 0,37
5 група	1221,0± 45,19 ^{1,2,3}	1269,09± 48,15 ^{1,2,3}	2011,13± 46,20 ^{1,2,3}	2570,09± 41,33 ^{1,2,3}	2398,19± 49,06 ^{1,2,3}	2529,95± 46,28 ^{1,2,3}	2580,82± 52,30 ^{1,2,3}	1395,10± 39,15 ^{1,2,3}	98,09± 8,15 ^{1,2,3}	6,13± 0,49	5,09± 0,31	5,19± 0,45 ^{2,3}
6 група	226,0± 20,03 ^{1,2}	364,13± 27,10 ^{1,2}	1085,10± 29,20 ^{1,2}	1302,30± 21,20 ^{1,2}	945,18± 34,20 ^{1,2}	529,10± 24,11 ^{1,2}	232,17± 20,77 ¹	193,94± 18,32 ^{1,2}	≤0,5	≤0,5	≤0,5	2,95± 0,26 ¹

1 група – інтактні тварини; 2 група – введення ЕЕТП 9; 3 група – введення «Ербісол»; 4 група – імунодепресія; 5 група – введення ЕЕТП 9 на тлі імунодепресії; 6 група – введення «Ербісол» на тлі імунодепресії; ¹ – достовірно відносно групи інтактних тварин; ² – достовірно відносно групи тварин із імунодепресією; ³ – достовірно відносно групи тварин із імунодепресією та введенням «Ербісол», ($p \leq 0,05$).

Таблиця 5.2

**Вміст ІЛ-6 в супернатанті ККМ, культивованих *in vitro*, у мишей із імунодепресією
під впливом ЕЕТП 9 (пг/мл; М±m; n=11)**

Групи тварин	ІЛ-6 (пг/мл)											
	1 год	3 год	6 год	9 год	12 год	16 год	20 год	24 год	3 доба	7 доба	14 доба	21 доба
1 група	4,78± 0,19	4,32± 0,22	4,45± 0,13	4,57± 0,20	4,51± 0,17	4,21± 0,16	4,29± 0,10	4,10± 0,11	4,36± 0,25	4,29± 0,27	4,47± 0,24	4,37± 0,20
2 група	8,80± 0,31 ¹	10,02± 0,24 ¹	17,10± 1,18 ¹	18,22± 1,41 ¹	20,52± 1,09 ¹	25,20± 2,20 ¹	19,34± 1,08 ¹	11,30± 1,02 ¹	4,28± 0,16	4,09± 0,11	4,31± 0,13	4,16± 0,15
3 група	4,0± 0,18	5,02± 0,32	7,1± 0,50 ¹⁾	9,22± 0,68 ¹	14,52± 1,16 ¹	4,20± 0,27	5,34± 0,26	5,91± 0,23	4,08± 0,37	4,10± 0,20	4,22± 0,18	4,39± 0,29
4 група	30,66± 3,02 ¹	45,39± 3,36 ¹	69,09± 6,48 ¹	127,30± 12,67 ¹	357,44± 23,90 ¹	149,53± 12,74 ¹	25,49± 2,30 ¹	18,33± 1,35 ¹	9,09± 0,81 ¹	22,31± 2,62 ¹	14,46± 1,11 ¹	23,05± 2,18 ¹
5 група	48,0± 3,12 ^{1,2,3}	70,12± 6,14 ^{1,2,3}	78,3± 5,64 ^{1,3}	280,6± 17,62 ^{1,2,3}	1109,0± 61,80 ^{1,2,3}	879,0± 54,82 ^{1,2,3}	632,17± 40,66 ^{1,2,3}	145,32± 12,48 ^{1,2,3}	5,04± 0,43 ^{2,3}	5,09± 0,45 ^{2,3}	5,24± 0,51 ^{2,3}	4,82± 0,35 ^{2,3}
6 група	29,51± 2,42 ^{1,2}	50,17± 4,24 ¹	60,13± 5,27 ¹	113,41± 10,86 ¹	370,34± 26,02 ^{1,2}	280,71± 24,28 ^{1,2}	109,47± 9,88 ^{1,2}	40,66± 3,9 ^{1,2}	8,03± 0,32 ¹	10,33± 0,09 ^{1,2}	11,21± 0,15 ^{1,2}	14,45± 0,12 ^{1,2}

1 група – інтактні тварини; 2 група – введення ЕЕТП 9; 3 група – введення «Ербісол»; 4 група – імунодепресія; 5 група – введення ЕЕТП 9 на тлі імунодепресії; 6 група – введення «Ербісол» на тлі імунодепресії; ¹ – достовірно відносно групи інтактних тварин; ² – достовірно відносно групи тварин із імунодепресією; ³ – достовірно відносно групи тварин із імунодепресією та введенням «Ербісол», ($p \leq 0,05$).

Таблиця 5.3

**Вміст Flt3-ligand в супернатанті ККМ, культивованих *in vitro*, у мишей із імунодепресією
під впливом ЕЕТП 9 (пг/мл; M±m; n=11)**

Групи тварин	Flt3-ligand (пг/мл)											
	1 год	3 год	6 год	9 год	12 год	16 год	20 год	24 год	3 доба	7 доба	14 доба	21 доба
1 група	323,49± 23,41	311,32± 21,21	327,0± 17,61	319,20± 19,32	336,0± 22,20	317,78± 24,01	310,09± 24,21	311,98± 20,04	328,32± 21,21	333,0± 17,61	319,20± 19,32	316,0± 22,20
2 група	351,16± 28,81	340,31± 29,11	327,10± 27,60	339,07± 29,02	335,0± 29,07	361,74± 29,41	341,15± 31,01	365,99± 32,11	340,31± 29,11	327,10± 27,60	339,07± 29,02	349,0± 29,07
3 група	314,19± 30,40	318,12± 31,41	297,14± 27,01	287,20± 27,72	266,18± 22,16	310,64± 30,19	322,01± 30,81	305,61± 29,93	318,12± 31,41	297,14± 27,01	287,20± 27,72	266,18± 25,16
4 група	367,15± 33,53 ¹	386,72± 34,71 ¹	447,0± 42,11 ¹	489,10± 31,19 ¹	529,13± 42,37 ¹	554,04± 49,84 ¹	589,89± 49,93 ¹	601,23± 52,84 ¹	389,54± 32,08 ¹	217,0± 20,11 ¹	285,10± 26,12	231,28± 21,04 ¹
5 група	315,99± 30,01	310,14± 31,78 ²	329,05± 32,74 ^{2,3}	349,28± 30,16 ^{2,3}	360,76± 35,11 ^{2,3}	385,15± 22,60 ^{1,2,3}	417,56± 34,29 ^{1,2}	380,72± 34,93 ^{1,2,3}	307,14± 30,70 ²	329,05± 31,74 ²	321,28± 29,76 ^{2,3}	344,76± 33,11 ^{2,3}
6 група	301,19± 23,41 ²	309,30± 25,01 ²	407,0± 37,61 ¹	417,21± 23,11 ^{1,2}	436,0± 27,56 ^{1,2}	431,78± 26,05 ^{1,2}	410,09± 28,02 ^{1,2}	411,98± 25,12 ^{1,2}	335,38± 29,01	289,0± 27,61 ^{1,2}	239,20± 21,32 ¹	267,0± 24,20 ¹

1 група – інтактні тварини; 2 група – введення ЕЕТП 9; 3 група – введення «Ербісол»; 4 група – імунодепресія; 5 група – введення ЕЕТП 9 на тлі імунодепресії; 6 група – введення «Ербісол» на тлі імунодепресії; ¹ – достовірно відносно групи інтактних тварин; ² – достовірно відносно групи тварин із імунодепресією; ³ – достовірно відносно групи тварин із імунодепресією та введенням «Ербісол», (p ≤ 0,05).

У групи мишей із радіаційною імунодепресією в динаміці першої доби спостерігалася хвилеподібна зміна рівня G-CSF, з піком вмісту на 9-ту годину коли рівень даного цитокіну був підвищеним у 200 разів порівняно з інтактними тваринами. Картина, що розгорталася в 1-шу добу після імуносупресивного впливу, демонструє характер реакції організму за умови порушення кровотворного гомеостазу, коли спостерігається індукований гемопоез, регуляція якого належить в основному G-CSF, та іншим раннім гемопоетичним факторам [179]. Починаючи від 3-ої доби після радіаційного імунопатологічного впливу і до кінця терміну спостереження концентрація G-CSF була нищою за чутливість тест-системи і відповідно нижчою за концентрацію у інтактних тварин, що, ймовірно свідчить про порушення та виснаження функціонального і, як наслідок регуляторного, потенціалу гемопоезіндукуючого мікрооточення.

Вміст IL-6 у мишей даної групи характеризувався поступовим підвищенням в період з 1-ої по 12-ту год спостереження, коли на 12-ту годину він досяг піку і перевищував значення у інтактних тварин в 79,0 разів. Період з 16-ої по 24-ту годину відмічено як період зниження концентрації IL-6 в динаміці, однак зі збереженням підвищених його значень по відношенню до інтактних тварин. 3-тя доба, коли реєструвалися мінімальні значення IL-6 в динаміці спостереження (перевищення значень порівняно з групою інтактних тварин лише в 11,0 разів), завершила період зниження цього показника в динаміці дослідження. Після чого знову було зареєстровано підвищення концентрації IL-6 у тварин з імунодепресією, яке продовжувало відзначатись до кінця експерименту (перевищення в 5,3 раза порівняно з інтактними тваринами на 21-шу добу).

Вміст Flt3-ligand в супернатанті ККМ культивованих *in vitro* у даної групи мишей характеризувався поступовим наростанням значень в динаміці першої доби вже з 3-ої години спостереження, коли він становив $(386,72 \pm 34,71)$ пг/мл порівняно з $(311,32 \pm 21,21)$ пг/мл у інтактних тварин, а на 24-ту збільшився вже майже вдвічі по відношенню до інтактних тварин. З 3-ої доби відбулося його зниження порівняно з 24-ою годиною (в 1,5 раза), але перевищував рівень у інтактних тварин на 19 %. Починаючи з 7-ої доби і надалі протягом усього періоду спостереження

рівень Flt3-ligand у мишей із імунодепресією навпаки був достовірно нижчий від інтактних тварин з мінімумом на 7-ту добу (в 1,5 раза).

За дослідження концентрації G-CSF в супернатанті клітин кісткового мозку культивованих *in vitro* в групі мишей із радіаційною імунодепресією застосування ЕЕТП 9 призвело до стійкого багаторазового підвищення його вмісту, що реєструвалося з 1-ої години по 3-тю добу спостереження порівняно із тваринами, що його не отримували. Пік концентрації G-CSF реєструвався на 20-ту годину (в 12,4 раза вище від групи контролю та в 494,0 разів вище ніж у інтактних тварин). На 3-тю добу відмічалось послаблення інтенсивності стимуляторного ефекту ЕЕТП 9 на синтез G-CSF, коли його вміст знизився порівняно з 24-ою год спостереження в 14,0 разів, однак зберігаючи переважання над рівнем у інтактних тварин у 20,0 разів. З 7-ої доби рівні цього показника вже не мали достовірної відмінності від значень у інтактних тварин.

Ймовірно, саме завдяки значному підвищенню рівня гемопоетичного фактору ранньої дії до 24-ої год після імунопатологічного впливу, та збереження, хоча і значно меншою мірою, стимулювального ефекту до 7-ої доби створюється підґрунтя для більш швидкого відновлення нормального стану гемопоезу, що продемонстровано нами у гематологічних та гістологічних дослідженнях.

Під впливом застосування «Ербісол» також була зареєстрована деяка стимуляція синтезу G-CSF ККМ культованими *in vitro*, мишей із імунодепресією, однак порівняно із даними, що були отримані під впливом ЕЕТП 9, стимуляція була виражена значно меншою мірою – найбільш значна відмінність була зареєстрована на 3-тю годину спостереження і складала 1,6 раза. З 16-ої год відбувалося поступове зниження концентрації досліджуваного показника в динаміці спостереження. Починаючи з 3-ої доби і до 14-ої доби експерименту концентрація G-CSF у мишей даної групи був нижчим, за чутливість набору ($\leq 0,5$ пг/мл), що нагадувало картину значень у групи контролю. Отже, за порівняння впливу ЕЕТП 9 та контрольного препарату було виявлено достовірну різницю у їх дії за показником концентрації G-CSF в супернатанті ККМ, культованих *in vitro* мишей в кожній часовій точці протягом усього дослідження.

На тлі застосування ЕЕТП 9 у імунодепресованих мишей в період з 1-ої по 24-ту годину спостерігалася стимуляція продукції ІЛ-6 в супернатанті ККМ. Пік підвищення рівня цього показника припав на 12-ту год після ушкоджуючого впливу, (перевищення в 3,1 раза) на протигагу значенням у групи контролю. В період з 12-ої години по 3-тю добу відбувалося поступове зниження концентрації досліджуваного показника в динаміці, однак, зі збереженням значного переважання значень порівняно із тваринами, що не отримували ЕЕТП 9. З 3-ої доби і до кінця терміну спостереження відбувається нормалізація вмісту ІЛ-6, коли в групі мишей із імунодепресією без застосування ЕЕТП 9 подібної картини не відзначалося.

Отже, на вже в перші години після індукції імунодепресії під впливом ЕЕТП 9 відбувається значна стимуляція синтезу ІЛ-6, що виражається в стійкому підвищенні його концентрації в супернатанті клітин КМ.

За застосування контрольного препарату достовірно підвищення рівня ІЛ-6 порівняно з тваринами із імунодепресією було зареєстровано в період з 16-ої години по 21-шу добу спостереження. Однак, ступінь стимуляції під впливом препарату порівняння був значно меншим, що виражалось як в коротшому її періоді, так і в достовірно відмінному вмісті ІЛ-6 в супернатанті клітин КМ від групи, якій застосовували ЕЕТП 9. В період з 3-ої по 21-шу добу концентрація ІЛ-6 в супернатанті ККМ, культивованих *in vitro*, за введення препарату порівняння була вищою ніж значення у інтактних тварин у 1,8 – 3,3 раза.

Під впливом ЕЕТП 9 концентрація Flt3-ligand у мишей із радіаційною імунодепресією в перші години спостереження не зазнала такого підйому, який спостерігався у імунодепресованих тварин, де мала місце вірогідне підвищення цього показника з 3-ої години по 21-шу добу після індукції імунодепресії порівняно з інтактними тваринами. Так на 24-ту годину, що співпадало з максимумом концентрації даного цитокіну, у тварин із імунодепресією за застосування ЕЕТП 9 його значення було в 1,6 раза нижчим ніж у тварин, які не отримували ЕЕТП 9. З 3-ої доби до кінця терміну спостереження їх значення були на нормальному рівні, коли, як вже зазначалось, у тварин із імунодепресією рівень

Flt3-ligand з 7-ої доби зазнав достовірного зниження по відношенню до інтактних тварин в 1,5 раза і не нормалізувався до завершення експерименту.

Вплив препарату порівняння також мав наслідком достовірне зниження по відношенню до значень у тварин із імунодепресією концентрації Flt3-ligand в супернатанті ККМ, культивованих *in vitro*, на 3-тю годину (в 1,3 раза), а також в період з 9-ої по 24-ту год (у 1,2 – 1,5 раза). Однак, очікуваної нормалізації, подібної до ефекту ЕЕТП 9 отримано не було, що виражалось у достовірному зниженні рівня Flt3-ligand в період з 7-ої по 21-шу добу після індукції імунодепресії в 1,2 раза.

Отже, під впливом препарату порівняння також відбувалася деяка стимуляція синтезу G-CSF, але по відношенню до ЕЕТП 9 в меншій мірі й не настільки пролонговано – з 3-ої по 21-шу добу його концентрація була за межами чутливості набору ($\leq 0,05$ пг/мл). Застосування препарату порівняння в продовж 1-ої доби після індукції імунодепресії дозволило спостерігати дещо нижчі концентрації ІЛ-6 в супернатанті ККМ ніж під впливом ЕЕТП 9, однак, із достовірно підвищеним рівнем його продукції в подальшій динаміці пострадіаційної імунодепресії порівняно з інтактними тваринами та тваринами із імунодепресією, яким вводили ЕЕТП 9. Під дією контрольного препарату значення Flt3-ligand у КМ мишей із імунодепресією на 21-шу добу спостереження все ще не досягали інтактних, тобто були достовірно підвищеними, однак, також характеризувалися тенденцією до нормалізації порівняно з групою контролю.

Різноманітність характеру підйому концентрації вказаних цитокінів пояснюється відмінностями у регуляції їх синтезу, а також, ймовірно, залежить від того, чи впливає пошкоджуючий вплив даного виду безпосередньо на рівень їх синтезу, або ж він змінюється внаслідок радіаційно-опосередкованого впливу на інші цитокіни, які є елементами регуляторної ланки синтезу гемопоетичних факторів, що розглядаються.

Таким чином, застосування ЕЕТП 9, завдяки модуляції синтезу в перші години після імунопатологічного впливу, спектру позитивних регуляторів гемопоезу – індукторів проліферації та диференціювання ГКС та клітин-

попередників, концентрації яких вимірювались в супернатанті клітин кісткового мозку, культивованих *in vitro*, сприяє більш швидкому та успішному відновленню гемопоезу, що створює у свою чергу передумови для ефективного імуногенезу [180].

5.2 Вплив ЕЕТП 9 на вміст цитокінів, регуляторів гемопоезу та імуногенезу в сироватці крові мишей із радіаційною імунодепресією

Цитокіни, що розглядаються в даній роботі, задіяні в стимуляції проліферації, диференціації та функціональній активації імунокомпетентних клітин. ІЛ-1, ІЛ-6 та ІЛ-4 є позитивними регуляторами гемопоезу. Відомою також є їх роль у забезпеченні виживаності тварин після дії критичних доз імунодепресуючого радіаційного випромінювання [181].

В експерименті встановлено, що під впливом ЕЕТП 9 у здорових мишей відзначено достовірне підвищення рівня сироваткового ІЛ-1 β в період з 1-ої по 20-ту годину спостереження із максимумом на 3 годину, коли значення цього показника перевищували такі у інтактних тварин в 40 разів. Починаючи з 24-ої години вміст цього цитокіну достовірно не відрізнявся від значень у інтактних тварин. Під впливом ЕЕТП 9 здоровим мишам відбувалося деяке підвищення вмісту ІЛ-6 порівнянно з інтактними тваринами із піком вмісту на 20-ту годину, коли спостерігалось 2-х-кратне перевищення значень в групі інтактних мишей. З 3-ої доби спостереження достовірна відмінність від значень у групі інтактних тварин у рівні цього показника вже не відзначалася. Введення здоровим мишам ембріонального екстракту призвело до змін вмісту ІЛ-4 в сироватці крові на 1-шу годину спостереження, коли реєструвалося його максимальне підвищення по відношенню до інтактних тварин (в 3 рази), на 9-ту (в 2,3 рази) та 20-ту годину (в 1,86 рази), в інші терміни спостереження його значення не були відмінними від значень в групі інтактних тварин.

Отже, на тлі застосування ЕЕТП 9 у здорових мишей відзначено деяке підвищення вмісту ІЛ-1 β та ІЛ-6 впродовж 1-ої доби спостереження, а також епізодичне незначне підвищення вмісту ІЛ-4 в сироватці крові.

У мишей із радіаційною імунодепресією (4 група) в динаміці 1-ої доби зареєстровано стрибкоподібне підвищення рівня ІЛ-1 β в сироватці крові. Динаміка даного показника характеризувалася 2-ма піками із наступним спадом, який однак не досягав фізіологічних значень за період експерименту. Перший пік сформувався на 3-тю годину, коли перевищення рівня ІЛ-1 β порівняно з інтактними тваринами було в 147,0 разів з подальшим спадом до 12-ої години із перевищенням вже в 39,0 разів. Наступний пік відбувся на 16-ту годину із відмінністю від інтактних значень в 193,0 раза із наступним поступовим спадом. В подальшій динаміці спостереження значення ІЛ-1 β у сироватці крові мишей із радіаційною імунодепресією так і не набули рівня властивого інтактним тваринам і на 21-шу добу експерименту перевищували останні в 9,5 раза (табл. 5.4).

Протягом усього періоду спостереження після індукції радіаційної імунодепресії у мишей даної групи відбувалося підвищення вмісту ІЛ-6 в сироватці крові. Картина зміни значень цього показника характеризувалася поступовим підйомом починаючи з 1-ої години спостереження із досягненням пікового значення на 9-ту годину (у 13,0 разів вище ніж у інтактних тварин). Після досягнення пікового значення відбулося поступове зниження вмісту ІЛ-6 в сироватці крові імунодепресованих тварин і на 7-му добу він перевищував значення у інтактних тварин вже в 2,0 раза. Однак, до кінця терміну спостереження рівень цього показника був підвищеним по відношенню до інтактних тварин не приймаючи нормальних значень.

Щодо вмісту ІЛ-4 у сироватці крові мишей із імунодепресією, то протягом усього експерименту він був достовірно вищим ніж у групи інтактних тварин. Пікового значення досліджуваній показник досяг на 12-ту год спостереження, коли він перевищував значення у інтактних тварин в 24,0 рази.

Отже, помітно, що в перші години після моделювання радіаційної імунодепресії відбувається викид прозапальних цитокінів ІЛ-1 β та ІЛ-6.

Нормалізації рівнів ІЛ-1 β та ІЛ-6 в сироватці крові мишей із імунодепресією не відбувається і в більш віддалені строки, залишаючись підвищеними впродовж усього періоду спостереження. Вміст ІЛ-4 в сироватці крові мишей даної групи також зазнає підвищення, особливо в динаміці першої доби після моделювання радіаційної імунодепресії, також залишаючись підвищеним впродовж усього строку спостереження (до 21-ої доби). Так, відомо, що стимуляція синтезу ІЛ-4, в процесі нормальної імунної відповіді сприяє обмежувальній протизапальній реакції організму. За умови ж променевого впливу, що компрометує імунну систему ІЛ-4 виступає чи не найголовнішим агентом супресії імунного реагування [172].

Під впливом ЕЕТП 9 відбулося підвищення вмісту ІЛ-1 β в тричі к 6-ій годині після моделювання радіаційної імунодепресії порівняно з групою, що не отримувала екстракт. На 12-ту годину спостереження реєструвалося все ще підвищене значення досліджуваного показника. Таким чином, за умови індукованої імунодепресії екстракт здійснює стимуляторний вплив на продукцію ІЛ-1 β , достовірно підвищуючи його рівень в сироватці крові, посилюючи цим відповідь СІ на радіаційну дію. Нормалізація рівня сироваткового ІЛ-1 β за застосування ЕЕТП 9 мишам із радіаційною імунодепресією відбувалося на 7-му добу спостереження і не мала вже достовірної відмінності від значень у групі інтактних тварин у кожній часовій точці дослідження до кінця терміну експерименту.

За введення ЕЕТП 9 мишам із радіаційною імунодепресією вміст ІЛ-6 підвищився в 38,0 разів через 3 години спостереження, після чого спостерігалось поступове зниження інтенсивності його стимуляції (в 20,6 раза на 6-ту годину), коли на 7-му добу спостереження рівень цього показника вже не мав достовірної відмінності від значень у інтактних тварин (табл. 5.5).

Таким чином, ЕЕТП 9 посилює реакцію організму шляхом стимуляції продукції ІЛ-6 в сироватці крові мишей впродовж 1-ої доби після імунодепресуючого впливу радіаційної природи зі стабілізацією рівня, що достовірно реєструється на 7-му добу спостереження.

Застосування ЕЕТП 9 мишам даної групи призвело до збільшення рівня протизапального цитокіну ІЛ-4 в сироватці крові мишей і забезпечило його наростання до 12-ої години спостереження, коли він досяг пікового рівня і перевищував в 2,5 раза значення у інтактних тварин (табл. 5.6). З 7-ої доби реєстрації даних вміст ІЛ-4 вже не мав вірогідної відмінності від значень у інтактних тварин, тоді, як вже зазначалося у імунодепресованих тварин, що не отримували ЕЕТП 9, значення цього показника були підвищеними до кінця терміну спостереження. Як відомо, ІЛ-4 обмежує продукцію макрофагами ІЛ-1 β і ІЛ-6, як прозапальних цитокінів в нормі реакції, тому достатній його синтез забезпечує збалансований розвиток і своєчасне обмеження запалення, однак пролонгований – провокує дезорганізацію активації імунних ланцюгів різних типів, що супроводжується поглибленням імунодепресії та знижує спроможність організму до протиінфекційного опору.

Таблиця 5.4

Вміст ІЛ-1 β в сироватці крові мишей із імунодепресією під впливом ЕЕТП 9, (пг/мл; М \pm σ ; n=11)

Групи тварин	ІЛ-1 β (пг/мл)											
	1 год	3 год	6 год	9 год	12 год	16 год	20 год	24 год	3 доба	7 доба	14 доба	21 доба
1 група	2,17 \pm 0,19	2,09 \pm 0,19	2,03 \pm 0,15	2,29 \pm 0,13	2,08 \pm 0,17	2,14 \pm 0,20	2,22 \pm 0,18	2,04 \pm 0,12	2,10 \pm 0,17	2,06 \pm 0,20	2,18 \pm 0,21	2,33 \pm 0,19
2 група	5,92 \pm 0,47 ¹	83,03 \pm 3,10 ¹	32,07 \pm 2,80 ¹	26,11 \pm 1,53 ¹	29,31 \pm 2,41 ¹	24,04 \pm 2,12 ¹	18,88 \pm 1,57 ¹	2,37 \pm 0,11	2,50 \pm 0,19	2,26 \pm 0,21	2,32 \pm 0,25	2,61 \pm 0,22
3 група	5,73 \pm 0,42 ¹	5,21 \pm 0,24 ¹	4,39 \pm 0,19 ¹	10,23 \pm 1,88 ¹	3,48 \pm 0,20 ¹	6,79 \pm 0,19 ¹	6,92 \pm 0,29 ¹	7,12 \pm 0,64 ¹	8,21 \pm 0,11 ¹	2,33 \pm 0,18	2,27 \pm 0,24	2,28 \pm 0,20
4 група	159,03 \pm 13,26 ¹	306,02 \pm 30,10 ¹	100,8 \pm 9,40 ¹	92,51 \pm 6,90 ¹	80,32 \pm 7,91 ¹	413,09 \pm 26,22 ¹	208,18 \pm 19,17 ¹	116,19 \pm 10,87 ¹	3,50 \pm 0,19 ¹	3,04 \pm 0,30 ¹⁾	13,22 \pm 0,14 ¹	22,18 \pm 0,20 ¹
5 група	578,0 \pm 45,19 ^{1,2,3}	417,0 \pm 31,0 ^{1,2}	325,0 \pm 26,31 ^{1,2}	290,44 \pm 16,71 ^{1,2,3}	234,31 \pm 20,15 ^{1,2,3}	729,95 \pm 44,28 ^{1,2,3}	675,82 \pm 52,30 ^{1,2,3}	395,10 \pm 36,15 ^{1,2,3}	98,09 \pm 8,15 ^{1,2,3}	2,21 \pm 0,19 ²	2,43 \pm 0,25 ^{2,3}	2,19 \pm 0,25 ^{2,3}
6 група	196,0 \pm 17,03 ^{1,2}	364,13 \pm 27,10 ^{1,2}	285,10 \pm 26,20 ^{1,2}	102,30 \pm 10,20 ^{1,2}	145,18 \pm 12,20 ^{1,2}	491,10 \pm 32,08 ^{1,2}	262,17 \pm 20,77 ^{1,2}	193,94 \pm 18,32 ^{1,2}	2,61 \pm 0,20 ^{1,2}	2,27 \pm 0,25 ²	9,13 \pm 0,19 ^{1,2}	8,43 \pm 0,52 ^{1,2}

1 група – інтактні тварини; 2 група – введення ЕЕТП 9; 3 група – введення «Ербісол»; 4 група – імунодепресія; 5 група – введення ЕЕТП 9 на тлі імунодепресії; 6 група – введення «Ербісол» на тлі імунодепресії; ¹ – достовірно відносно групи інтактних тварин; ² – достовірно відносно групи тварин із імунодепресією; ³ – достовірно відносно групи тварин із імунодепресією та введенням «Ербісол», ($p \leq 0,05$).

Таблиця 5.5

Вміст ІЛ-6 в сироватці крові мишей із радіаційною імунодепресією під впливом ЕЕТП 9, (пг/мл; М±σ; n=11)

Групи тварин	ІЛ-6 (пг/мл)											
	1 год	3 год	6 год	9 год	12 год	16 год	20 год	24 год	3 доба	7 доба	14 доба	21 доба
1 група	7,92± 0,16	7,85± 0,12	7,70± 0,13	7,64± 0,18	7,94± 0,22	8,04± 0,17	7,90± 0,21	7,79± 0,23	8,09± 0,15	7,66± 0,17	7,94± 0,24	8,00± 0,18
2 група	8,82± 0,11 ¹	8,30± 0,15	8,17± 0,20	10,32± 1,19 ¹⁾	8,91± 0,15	15,20± 1,20 ¹	19,34± 1,08 ¹	11,30± 1,02 ¹	8,22± 0,21	8,16± 0,25	8,00± 0,27	8,11± 0,29
3 група	7,30± 0,55	7,95± 0,31	7,49± 0,38	7,22± 0,34	7,27± 0,50	8,20± 0,34	10,34± 1,06 ¹	8,91± 0,73	8,09± 0,15	7,66± 0,19	7,94± 0,24	8,00± 0,18
4 група	20,62± 2,02 ¹	71,02± 6,20 ¹	75,04± 6,30 ¹	98,12± 7,56 ¹	69,01± 5,03 ¹	40,28± 3,07 ¹	31,10± 2,37 ¹	25,39± 2,21 ¹	27,89± 2,41 ¹	15,96± 1,43 ¹	20,99± 2,10 ¹	24,06± 2,98 ¹
5 група	48,0± 3,12 ^{1,2,3}	2695,0± 24,1 ^{1,2,3}	1548,0± 82,0 ^{1,2,3}	384,11± 37,96 ^{1,2,3}	171,03± 22,0 ^{1,2,3}	129,06± 11,32 ^{1,2,3}	104,19± 10,72 ^{1,2,3}	15,32± 1,23 ^{1,2,3}	9,74± 0,83 ^{1,2,3}	7,39± 0,48 ^{2,3}	7,55± 0,59 ^{2,3}	8,34± 0,73 ^{2,3}
6 група	28,67± 2,16 ^{1,2}	367,18± 20,34 ^{1,2}	120,44± 11,30 ^{1,2}	117,05± 10,50 ^{1,2}	80,13± 7,21 ^{1,2}	62,36± 5,59 ^{1,2}	51,65± 4,30 ^{1,2}	21,16± 2,04 ^{1,2}	20,79± 2,65 ^{1,2}	11,94± 1,09 ^{1,2}	12,79± 1,47 ^{1,2}	14,17± 1,53 ^{1,2}

1 група – інтактні тварини; 2 група – введення ЕЕТП 9; 3 група – введення «Ербісол»; 4 група – імунодепресія; 5 група – введення ЕЕТП 9 на тлі імунодепресії; 6 група – введення «Ербісол» на тлі імунодепресії; ¹ – достовірно відносно групи інтактних тварин; ² – достовірно відносно групи тварин із імунодепресією; ³ – достовірно відносно групи тварин із імунодепресією та введенням «Ербісол», (p ≤ 0,05).

Таблиця 5.6

Вміст ІЛ-4 в сироватці крові мишей із радіаційною імунодепресією під впливом ЕЕТП 9, (пг/мл; $M \pm \sigma$; $n=11$)

Групи тварин	ІЛ-4 (пг/мл)											
	1 год	3 год	6 год	9 год	12 год	16 год	20 год	24 год	3 доба	7 доба	14 доба	21 доба
1 група	3,67± 0,19	3,81± 0,16	4,06± 0,23	3,52± 0,21	4,19± 0,24	3,74± 0,28	4,15± 0,20	3,42± 0,21	4,11± 0,25	4,34± 0,20	4,16± 0,27	3,76± 0,22
2 група	10,89± 0,12 ¹	4,86± 0,30	3,41± 0,31	8,16± 0,24 ¹⁾	5,04± 0,42	3,96± 0,35	7,74± 0,68 ¹	3,92± 0,33	3,84± 0,28	4,62± 0,34	4,50± 0,40	3,74± 0,28
3 група	3,77± 0,31	3,05± 0,34	3,58± 0,29	3,92± 0,34	3,14± 0,39	3,12± 0,35	4,33± 0,42	3,39± 0,44	4,17± 0,31	2,97± 0,25	3,07± 0,16	3,22± 0,29
4 група	3,96± 0,22	76,03± 6,80 ¹	90,04± 7,01 ¹	97,28± 8,36 ¹	100,02± 9,70 ¹	78,03± 7,19 ¹	24,33± 2,49 ¹	4,02± 0,58 ¹	5,39± 0,22 ¹	29,62± 2,41 ¹	35,91± 3,84 ¹	33,17± 3,26 ¹
5 група	20,96± 2,48 ^{1,2,3}	102,03± 9,02 ^{1,2,3}	150,04± 1,41 ^{1,2,3}	219,0± 2,04 ^{1,2,3}	250,02± 24,94 ^{1,2,3}	42,17± 4,25 ^{1,2,3}	13,26± 1,15 ^{1,2,3}	8,27± 0,42 ^{1,2,3}	5,01± 0,58 ^{1,2,3}	4,86± 0,30 ^{2,3}	5,07± 0,53 ^{2,3}	4,21± 0,35 ^{2,3}
6 група	15,19± 1,33 ^{1,2}	79,17± 6,34 ¹	108,0± 10,29 ^{1,2}	105,6± 10,31 ^{1,2}	139,29± 11,03 ^{1,2}	67,03± 6,29 ¹	20,06± 2,17 ¹	5,29± 0,42 ^{1,2}	5,59± 0,53 ²	17,88± 1,69 ^{1,2}	9,08± 0,83 ^{1,2}	15,01± 0,41 ^{1,2}

1 група – інтактні тварини; 2 група – введення ЕЕТП 9; 3 група – введення «Ербісол»; 4 група – імунодепресія; 5 група – введення ЕЕТП 9 на тлі імунодепресії; 6 група – введення «Ербісол» на тлі імунодепресії; ¹ – достовірно відносно групи інтактних тварин; ² – достовірно відносно групи тварин із імунодепресією; ³ – достовірно відносно групи тварин із імунодепресією та введенням «Ербісол», ($p \leq 0,05$).

Застосування препарату порівняння підвищувало рівень сироваткового ІЛ-1 β з 1-ої по 24-ту годину після індукції імунодепресії в 1,2 – 2,8 раза порівняно зі значеннями у групи тварин із імунодепресією. На 14-ту та 21-шу добу за застосування препарату порівняння у мишей із імунодепресією рівень ІЛ-1 β перевищує нормальні рівні в 4,2 та 3,6 раза відповідно, коли, як вже зазначалося, за застосування ЕЕТП 9 нормалізація рівня даного показника відбулася на 7-му добу спостереження.

Значно меншою мірою за ЕЕТП 9 препарат порівняння викликає підвищення рівня ІЛ-6 в сироватці крові мишей із імунодепресією в динаміці першої доби спостереження (переважання над рівнями ІЛ-6 у мишей із імунодепресією в 1,2 – 5,2 раза). Нормалізації рівня сироваткового ІЛ-6 у мишей даної групи не відбувалося до кінця експерименту і на 21-шу добу його рівень переважав фізіологічний в 1,8 раза.

В період з 1-ої години по 3-тю добу спостереження застосування препарату порівняння сприяло підвищенню вмісту ІЛ-4 в сироватці крові мишей значно меншою мірою ніж застосування ЕЕТП 9: на 1-шу год переважання над значеннями в групі мишей із імунодепресією було в 3,8 раза, на 6-ту год – в 1,2 раза, 12-ту – в 1,4 раза. При цьому очікуваної нормалізації вмісту ІЛ-4 за застосування препарату порівняння за період дослідження у мишей із імунодепресією не простежувалося, коли на 21-шу добу значення цього показника перевищувало фізіологічне в 3,9 раза.

Таким чином, на відміну від препарату порівняння, застосування ЕЕТП 9 викликає більш значне підвищення концентрації сироваткових ІЛ-1 β та ІЛ-6 в динаміці 1-ої доби після імунопатологічного впливу. Нормальні рівні ІЛ-1 β та ІЛ-6 у разі застосування ЕЕТП 9 мишам із імунодепресією реєструвалися вже на 7-му добу спостереження. Характерним ефектом застосування ЕЕТП 9 мишам із імунодепресією є стимуляція синтезу ІЛ-4, рівень якого збільшувався в кожній часовій точці дослідження порівнянно з групою тварин, що не отримували екстракт, та досягненням фізіологічного рівня на 7-му добу. Отримані дані

свідчать щодо здатності ЕЕТП 9 модулювати рівень синтезу низки важливих регуляторів гемопоезу та імуногенезу, що є важливим в умовах кількісного та функціонального дефіциту гемопоезу та імуногенезу [183–187].

РОЗДІЛ 6
ВІДНОВЛЕННЯ ФУНКЦІОНАЛЬНОЇ АКТИВНОСТІ КЛІТИН
ІМУННОЇ СИСТЕМИ МИШЕЙ ІЗ РАДІАЦІЙНОЮ ІМУНОДЕПРЕСІЄЮ
ПІД ВПЛИВОМ ЕЕТП 9

6.1 Вплив ЕЕТП 9 на відновлення специфічного антитілоутворення за імунізації мишей із радіаційною імунодепресією

З метою дослідження, зокрема, відновлення функціонального стану В-клітин у мишей із радіаційною імунодепресією під впливом ЕЕТП 9 було вивчено формування адаптивного імунітету після вакцинації сезонною вакциною проти грипу «Inflexal V».

Вакцинація тварин здійснювалась на 14-ту добу після дії γ -випромінювання, забір крові з метою визначення специфічних антитіл здійснювався через 14 та 30 діб після вакцинації. Дані наведені у вигляді середнього геометричного титру (СГТ) із розрахунком коефіцієнту варіації (cv).

Так, через 14 діб після одноразової імунізації протигрипозна вакцина «Inflexal V» викликала появу певного рівня специфічних антитіл в сироватці крові здорових мишей. В середньому за трьома антигенами, що входять до складу вакцини їх СГТ у імунізованих здорових мишей склав 1:90,87 (табл. 6.1). За вакцинації на тлі застосування ЕЕТП 9 відбулося деяке потенціювання антитілогенезу й титри специфічних антитіл до антигенних складових вакцини в середньому склали 1:162,42. При умові вакцинації на тлі застосування препарату порівняння титри специфічних антитіл до антигенних складових вакцини достовірно перевищували рівні у здорових тварин без застосування будь-яких субстанцій і в середньому склали 1:121,21.

Таблиця 6.1

Середньогометричні титри специфічних антитіл до антигенів вірусу грипу після імунізації вакциною «Inflexal V» мишей із радіаційною імунодепресією під впливом ЕЕТП 9 (M±σ, n=21)

Групи тварин, (n=21)	Вірус А (H1N1)		Вірус А (H3N2)		Вірус В		Середнє за 3 антигенами
	СГТ	CV	СГТ	CV	СГТ	CV	
14 доба після вакцинації							
1 група	1:90,74	25,17	1:96,65	30,01	1:85,20	15,15	1:90,87
2 група	1:174,55	30,30	1:152,73	25,97	1:160,0	18,18	1:162,42
3 група	1:130,90	28,23	1:123,64	39,67	1:109,09	37,03	1:121,21
4 група	1:24,16	37,62	1:21,30	37,76	1:20,00	41,0	1:21,82
5 група	1:152,73	25,97	1:94,55	25,17	1:76,37	25,96	1:107,88
6 група	1:51,46	30,0	1:62,17	28,28	1:66,22	22,97	1:59,95
7 група	-	-	-	-	-	-	-
30 доба після вакцинації							
1 група	1:529,76	22,97	1:564,22	25,00	1:681,63	15,15	1:591,87
2 група	1:1163,64	16,36	1:1134,55	20,98	1:1076,36	27,51	1:1124,85
3 група	1:725,96	25,17	1:600,92	18,18	1:640,00	16,60	1:655,63
4 група	1:102,93	33,94	1:116,76	42,02	1:90,75	25,17	1:103,48
5 група	1:497,41	28,28	1:529,76	30,03	1:564,22	16,36	1:530,46
6 група	1:494,55	32,08	1:305,45	43,29	1:407,27	41,56	1:402,43
7 група	-		-		-		

1 група – імунізовані миші, 2 група – імунізовані миші із застосуванням ЕЕТП 9; 3 група – імунізовані миші із застосуванням препарату порівняння; 4 група – імунізовані миші із імунодепресією; 5 група – імунізовані миші із імунодепресією під впливом ЕЕТП 9; 6 група – імунізовані миші із імунодепресією під впливом препарату порівняння; 7 група – фізіологічний розчин.

Далі було встановлено, що радіаційно-індукована імунодепресія супроводжується утворенням специфічних антитіл у відповідь на введення вакцини «Inflexal V» на певному рівні, що значно відрізнявся, в 4,1 раза, від контрольного та в середньому за трьома антигенами складав 1:21,82 порівняно з 1:90,87 в групі імунізованих здорових тварин.

Під впливом ЕЕТП 9 у мишей із радіаційною імунодепресією СГТ на 14-ту добу після вакцинації знаходився на рівні даного показника у здорових мишей, та складав 1:107,88, що в 5,0 разів перевищувало рівні у імунодепресованих тварин без застосування будь-яких засобів.

За дослідження титру специфічних антитіл після імунізації у тварин із радіаційною імунодепресією під дією препарату порівняння їх значення перевищували рівні у імунодепресованої групи тварин в середньому за трьома антигенами в 2,7 раза, ($p \leq 0,05$).

Таким чином, ефекти ЕЕТП 9 та препарату порівняння за показником формування специфічних протигрипозних антитіл на 14-ту добу після вакцинації відрізнялися в 2 раза.

На 30-ту добу після одноразової імунізації СГТ специфічних антитіл в сироватці крові здорових мишей в середньому за трьома антигенами, що входять до складу вакцини, підвищився в 6 разів порівняно із значеннями отриманими на 14-ту добу після вакцинації і склав 1:591,87 (табл. 6.1). В групі вакцинованих здорових мишей після застосування ЕЕТП 9, СГТ специфічних антитіл підвищились в 7,0 разів в порівнянні з 14-ою добою. Після застосування препарату порівняння – в 5,4 раза. На 30-ту добу після імунізації у імунодепресованих тварин рівень СГТ антитіл порівняно зі значеннями на 14-ту добу після вакцинації підвищився в середньому за трьома антигенами в 4,7 раза. Порівняно зі здоровими тваринами вакцинація у імунодепресованих тварин на 30-ту добу не була на стільки ж ефективною, так рівень антитіл склав 17,4 % від рівня у здорових вакцинованих тварин. На 30-ту добу після вакцинації імунодепресованих мишей із застосуванням ЕЕТП 9 СГТ антитіл підвищився у

5,0 разів в динаміці. На цю добу застосування ЕЕТП 9 тваринам із імунодепресією призводить до утворення вищих, у 5,1 раза, титрів протигрипозних антитіл у відповідь на імунізацію порівняно з групою контролю. На цю ж добу після вакцинації імунодепресованих мишей із застосуванням «Ербісол» СГТ антитіл підвищився в 6,7 раза в динаміці спостереження. Порівняно з групою імунодепресованих мишей СГТ антитіл під впливом препарату порівняння був вище лише в 3,8 раза по відношенню до СГТ протигрипозних антитіл у відповідь на імунізацію без застосування будь-яких засобів.

Окрім різниці в середніх геометричних титрах привернула увагу різна однорідність антитілогенезу серед дослідних груп, оцінена за лінійним коефіцієнтом варіації. Останній є мірою варіації титру антитіл в межах групи зразків сироваток. Відповідно, вважається, що чим нижче значення коефіцієнту варіації, тим реакція відповіді є більш однорідною.

Так, значення коефіцієнту варіації титру антитіл до кожного з антигенів в групі здорових імунізованих тварин на 14-ту добу не перевищувало 30,0, на 30-ту добу – 25,0.

В межах групи зразків, отриманих від імунодепресованих тварин на 14-ту добу коефіцієнт варіації був значно вищим і досягав значення 41,0, на 30 добу – 42,02. За імунізації імунодепресованих під впливом ЕЕТП 9 тварин на 14-ту та 30-ту добу коефіцієнт варіації титрів специфічних антитіл не перевищував 30,03. Під впливом препарату порівняння коефіцієнт варіації на 14-ту та 30-ту добу досягав 30,0 та 43,29 відповідно.

Таким чином, здорові тварини під впливом ЕЕТП 9 відповідають утворенням вищого, в 1,8 раза, середньгеометричного титру специфічних антитіл на імунізацію вакциною «Inflexal V» порівняно зі здоровими тваринами із коефіцієнтом варіації, що не перевищує такий у здорових мишей.

Застосування ЕЕТП 9 мишам із радіаційною імунодепресією сприяє більш однорідному антитілогенезу ($cv \leq 30,0$ на противагу $cv \geq 42,02$), який крім того за показником СГТ на 14-ту добу після імунізації протигрипозною вакциною

перевищує значення у імунодепресованих мишей в 5,0 разів, на 30 добу – в 5,1 раза. Препарат порівняння призводить до підвищення СГТ антитіл на 14-ту добу після вакцинації в 2,7 раза та в 3,8 раза на 30-ту добу [188].

6.2 Вплив ЕЕТП 9 на відновлення функціональної активності Т-лімфоцитів у мишей із індукованою імунодепресією

Функціональна активність лімфоцитів у мишей із радіаційно-індукованою імунодепресією була оцінена за здатністю цих клітин до спонтанної та індукованої мітогеном бласттрансформації. Джерелом лімфоцитів слугувала селезінка тварин усіх дослідних та контрольних груп. У якості індуктору РБТЛ був обраний поліклональний Т-клітинний мітоген ФГА. Під впливом ЕЕТП 9 та препарату порівняння у здорових мишей спостерігалось деяке підвищення індексу реакції спонтанної та індукованої бласттрансформації лімфоцитів на 3-тю добу. Індекс ФГА-індукованої реакції за застосування як ЕЕТП 9, так і препарату порівняння хоча і не суттєво, але достовірно був вищим по відношенню до здорових тварин, яким вводили фізіологічний розчин – $(45,32 \pm 4,82)$ % порівняно з $(36,2 \pm 3,40)$ % та $(46,39 \pm 4,07)$ % проти $(36,2 \pm 3,40)$ %, відповідно, ($p \leq 0,05$).

Поряд із цим важливим спостереженням є відсутність на тлі застосування вказаного засобу гіперреакції імунної системи, оскільки, як відомо, надмірне підвищення індексів стимульованої реакції може свідчити про запуск аутоімунітету.

На 3-тю добу за дії ЕЕТП 9 мишам із імунодепресією реєструється зниження спонтанної РБТЛ на 25,4 % та на 44,7 % зниження індукованої реакції від рівнів у інтактних тварин. У мишей же із радіаційною імунодепресією спостерігалось зниження спонтанної реакції в 2,9 раза та в 3,0 раза індексу ФГА-індукованої реакції. Подібна картина збереглася і на 7-му добу. На 14-ту добу під дією ЕЕТП 9 мишам із імунодепресією рівень спонтанної реакції складав 91 % норми, а рівень індукованої реакції – 75,6 % значень у інтактних мишей. В цей час

під впливом препарату порівняння ці показники становили – 65,6 % та 75,7 % рівня у інтактних тварин відповідно (рис. 6.1).

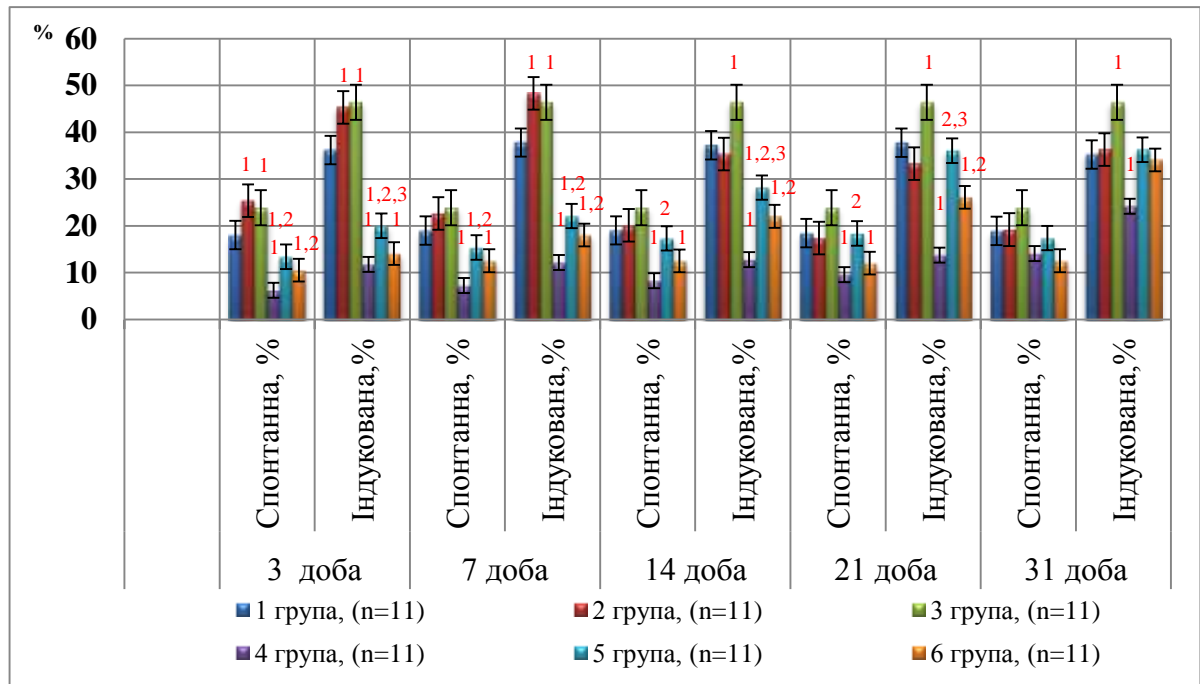


Рис. 6.1. Спонтанна та індукована реакція бласттрансформації лімфоцитів у мишей із радіаційною імунодепресією під впливом ЕЕТП 9: 1 група – інтактні тварини, (n=11); 2 група – тварини із застосуванням ЕЕТП 9, (n=11); 3 група – тварини із застосуванням препарату порівняння, (n=11); 4 група – тварини із імунодепресією, (n=11); 5 група – тварини із імунодепресією та застосуванням ЕЕТП 9, (n=11); 6 група – тварини із імунодепресією та застосуванням препарату порівняння, (n=11); ¹ – достовірно відносно інтактних тварин, $p \leq 0,05$; ² – достовірно групи тварин із радіаційною імунодепресією, $p \leq 0,05$; ³ – достовірно відносно групи тварин із застосуванням препарату порівняння, $p \leq 0,05$

Застосування ЕЕТП 9 сприяло відновленню функціонального стану Т-лімфоцитів на 21-шу добу після індукції імунодепресії, коли рівень спонтанної та індукованої реакції бласттрансформації лімфоцитів у мишей даної групи не мав достовірної відмінності від інтактних тварин. В той час у мишей без застосування

будь-яких засобів ці показники були зниженими в 1,9 та 2,7 раза відповідно, а повне відновлення функцій цих клітин відбувалося лише на 31-шу добу.

За розгляду ефекту, що здійснював «Ербісол», було відзначено відсутність відновлення функціональної здатності Т-лімфоцитів на 21-шу добу на протилежність ефекту, що було констатовано за дії ЕЕТП 9. Так рівень спонтанної РБТЛ у мишей даної групи складав 65,6 % норми, а рівень індукованої – 59,2 % від значень у інтактних тварин. Повне відновлення здатності лімфоцитів мишей із імунодепресією до спонтанної та мітоген-індукованої бласттрансформації під дією препарату порівняння спостерігалось лише на 31-шу добу експерименту.

За застосування препарату порівняння мишам із радіаційною імунодепресією рівень індексу спонтанної РБТЛ не мав достовірної відмінності від рівня цього показнику у тварин із імунодепресією без застосування будь-яких засобів – $(12,54 \pm 2,7)$ % проти $(7,21 \pm 1,9)$ %. Рівень же індукованої ФГА реакції у мишей даної групи досягав значень у імунодепресованих тварин із застосуванням ЕЕТП 9, а відповідно і значень у здорових тварин із введенням фізіологічного розчину. Таким чином, застосування ЕЕТП 9 мишам із променевою імунодепресією сприяє відновленню функціонального стану лімфоцитів за показником спонтанної та мітоген-індукованої реакції бласттрансформації лімфоцитів. Застосування препарату порівняння мишам із імунодепресією призводить лише до відновлення здатності даних клітин відповідати бласттрансформацією на мітоген, підвищення ж рівня індексу спонтанної РБТЛ при застосуванні *in vivo* «Ербісол» зареєструвати не вдалося.

6.3 Вплив ЕЕТП 9 на відновлення функціональної активності нейтрофілів периферичної крові мишей із радіаційно-індукованою імунодепресією

Відомо, що важливим елементом реакції, що відбуваються в системі імунітету є нейтрофільні лейкоцити. В зоні запалення вони є найважливішим

джерелом медіаторів, зокрема, IL-1, IL-6, TNF- α , IL-8. Під місцевим впливом цитокінів відбувається концентрація в тканині, що перебуває у стані запалення, гуморальних факторів імунного захисту. Під впливом IL-1, IL-6, IL-8, IFN- γ , TNF- α , що продукуються активованими нейтрофілами, а також моноцитами/макрофагами, їх фагоцитарна, метаболічна й бактерицидна активність у нормі реакції підвищуються в декілька разів. Таким чином, нейтрофіли як продуценти низки цитокінів і як ефектори цитокінів є важливими регуляторами імунних реакцій. Мікробіцидні властивості нейтрофілів забезпечуються гідролітичними ферментами, катіонними білками та їх здатністю продукувати активні форми кисню, оксиду азоту. Шляхом продукції G-CSF та GM-CSF нейтрофіли активно впливають на гемопоез [181].

Дослідження динаміки показників стану вродженого імунітету у мишей із радіаційно-індукованою імунодепресією під впливом екстракту із ембріональних тканин птахів включало оцінку функціонального стану нейтрофільних лейкоцитів периферичної крові, який визначали за фагоцитарним індексом (Фі), фагоцитарним числом (Фч), показниками НСТ-тесту та за вмістом катіонних білків. Так, значення Фі та Фч нейтрофілів периферичної крові у здорових тварин із застосуванням ЕЕТП 9 та препарату порівняння не зазнали достовірного підвищення порівняно з інтактними тваринами впродовж усього терміну спостереження.

У мишей із радіаційно-індукованою імунодепресією достовірно зниження значення Фі реєструвалося починаючи з перших етапів дослідження і зберігалося зниженим до кінця терміну спостереження. На 3-тю добу Фі було зниженим незначно – на 17,1 % порівняно з інтактними тваринами, Фч зниження взагалі не зазнало, (рис. 6.2, 6.3). На 7-му добу Фі було зниженим на 28,6 %, також вперше в динаміці відзначено достовірно зниження Фч – на 28,6 % від інтактних значень.

Найбільшого падіння досліджувані показники зазнали у даної групи на 14-ту добу досліду – Фі на 38,5 %, Фч – на 38 % порівняно зі значеннями у інтактних тварин. На 21-шу добу все ще не було зареєстровано нормалізації ані

Фі, ані Фч у групи тварин із радіаційною імунодепресією, коли значення цих показників були достовірно зниженими порівняно з інтактними тваринами на 24,1 % та 35,3 % відповідно (рис. 6.2, 6.3).

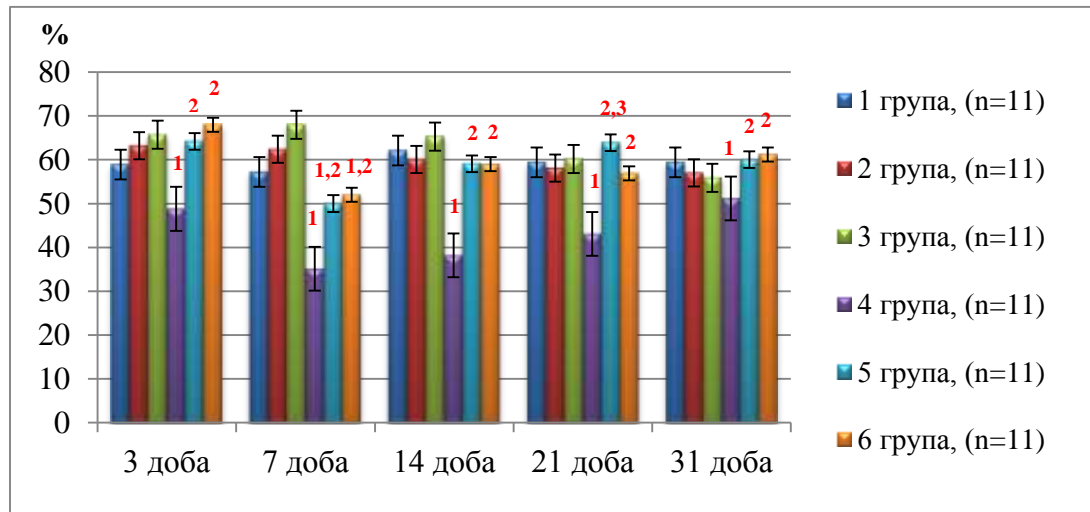


Рис. 6.2. Фагоцитарний індекс нейтрофілів периферичної крові мишей із імунодепресією під впливом ЕЕТП 9: 1 група – інтактні тварини, (n=11); 2 група – тварини із застосуванням ЕЕТП 9, (n=11); 3 група – тварини із застосуванням препарату порівняння, (n=11); 4 група – тварини із імунодепресією, (n=11); 5 група – тварини із імунодепресією та застосуванням ЕЕТП 9, (n=11); 6 група – тварини із імунодепресією та застосуванням препарату порівняння, (n=11); ¹ – достовірно відносно інтактних тварин, $p \leq 0,05$; ² – достовірно відносно групи тварин із радіаційною імунодепресією, $p \leq 0,05$; ³ – достовірно відносно групи тварин із застосуванням препарату порівняння, $p \leq 0,05$

На 3-тю добу спостереження рівні Фі та Фч у групи мишей із імунодепресією на тлі застосуванням ЕЕТП 9 були достовірно вищими ніж у тварин, що його не отримували: Фі на 3-тю добу був вищим в 1,3 раза від значень у імунодепресованих мишей, Фч – в 1,25 раза.

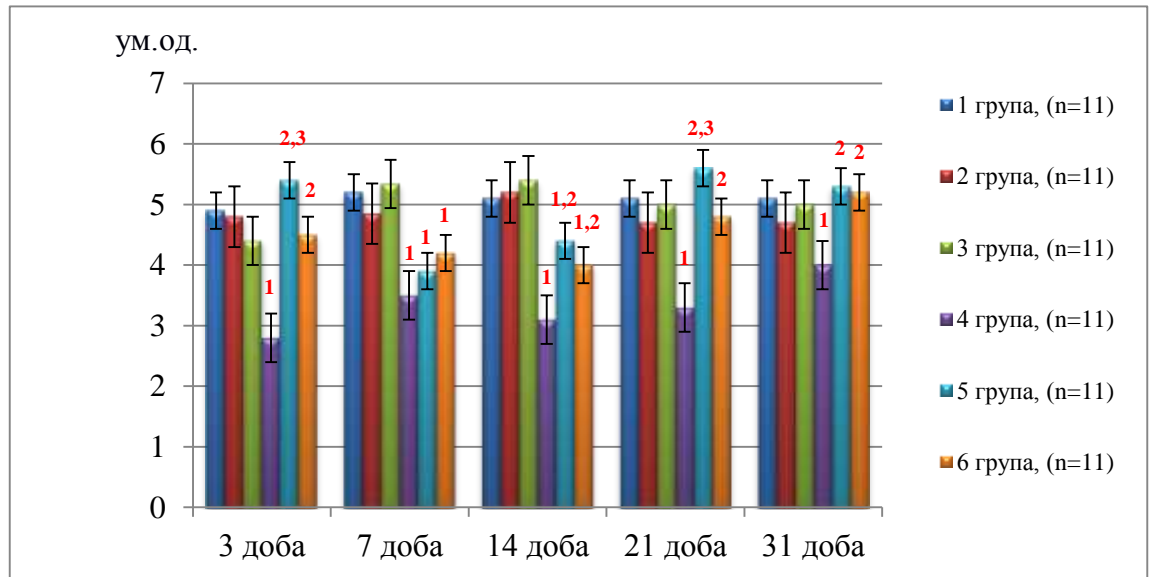


Рис. 6.3. Фагоцитарне число нейтрофілів периферичної крові мишей із імуносупресією під впливом ЕЕТП 9: 1 група – інтактні тварини, (n=11); 2 група – тварини із застосуванням ЕЕТП 9, (n=11); 3 група – тварини із застосуванням препарату порівняння, (n=11); 4 група – тварини із імуносупресією, (n=11); 5 група – тварини із імуносупресією та застосуванням ЕЕТП 9, (n=11); 6 група – тварини із імуносупресією та застосуванням препарату порівняння, (n=11); ¹ – достовірно відносно інтактних тварин, $p \leq 0,05$; ² – достовірно відносно групи тварин із радіаційною імуносупресією, $p \leq 0,05$; ³ – достовірно відносно групи тварин із застосуванням препарату порівняння, $p \leq 0,05$

Рівень Фі під впливом ЕЕТП 9 досяг фізіологічних значень на 14-ту добу спостереження, коли у тварин із імуносупресією цей показник був в 1,6 раза нижчими від значень у інтактних тварин. Рівень Фч нормалізувався на 21-шу добу спостереження, коли у тварин групи контролю цей показник був зниженим в 1,2 раза порівняно з групою інтактних тварин.

За застосування препарату порівняння на 3-тю та 7-ту добу спостереження відзначено достовірне підвищення Фі в 1,4 раза та 1,5 раза відповідно, без достовірної різниці з рівнем Фі у мишей із імуносупресією у разі застосування

ЕЕТП 9. Відновлення до фізіологічного рівня фагоцитарного індексу нейтрофілів під дією «Ербісол» реєструється також на 14-ту добу. Фч під його впливом у мишей із радіаційною імунодепресією також досягає фізіологічного рівня на 21-шу добу, як із за дії ЕЕТП 9 [189].

Метаболічну активність нейтрофільних гранулоцитів визначали за допомогою тесту відновлення нитросинього тетразолію (НСТ-тесту). Проведення спонтанної реакції характеризує ступінь функціональної активності нейтрофілів *in vivo*, стимульована ж реакція демонструє функціональний резерв досліджуваних клітин та дозволяє робити висновок щодо можливих порушень в їх бактерицидній здатності.

Дані спонтанної та стимульованої зимозаном реакцій НСТ-тесту представлено у вигляді коефіцієнту стимуляції. Так, показано достовірне нединамічне зниження цього показника у групи опромінених тварин порівняно з інтактними тваринами впродовж усього терміну спостереження. В середньому коефіцієнт стимуляції у групи з імунодепресією був зниженим на 22,1 % порівняно з групою інтактних мишей впродовж спостереження.

На 7-му добу застосування ЕЕТП 9 мишам із імунодепресією коефіцієнт стимуляції був на 13 % вище ніж у тварин контрольної групи. За застосування ЕЕТП 9 коефіцієнт стимуляції у НСТ-тесті у мишей із імунодепресією набуває фізіологічних значень на 21-шу добу спостереження, коли в групі контролю подібного відновлення функціонального стану нейтрофілів периферичної крові не спостерігається навіть на 31-шу добу експерименту.

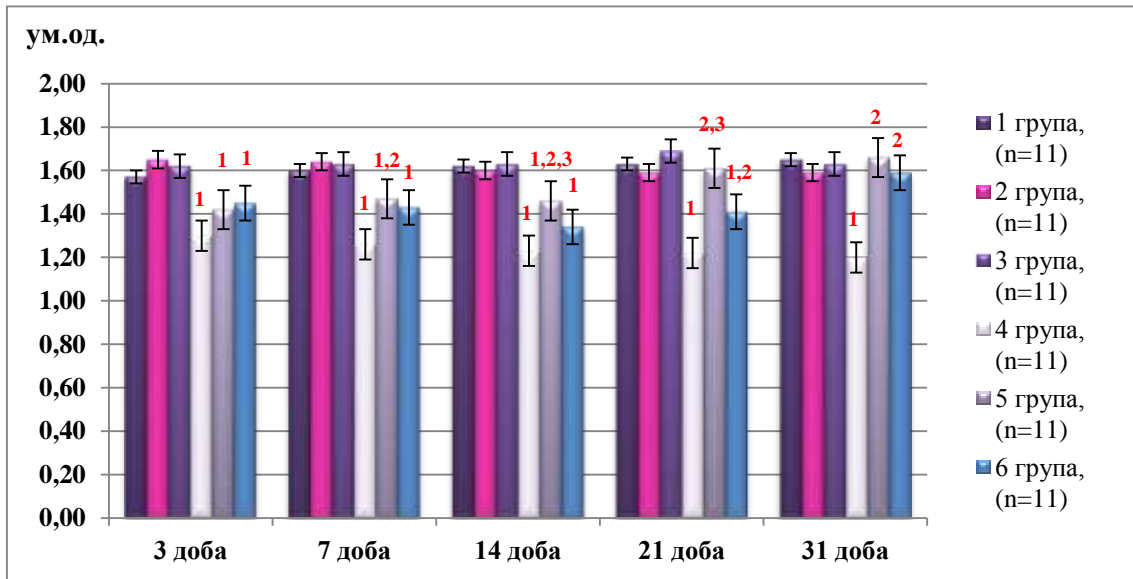


Рис. 6.4. Коефіцієнт стимуляції в НСТ-тесті у мишей із радіаційною імунодепресією під впливом ЕЕТП 9, ум. од.: 1 група – інтактні тварини, (n=11); 2 група – тварини із застосуванням ЕЕТП 9, (n=11); 3 група – тварини із застосуванням препарату порівняння, (n=11); 4 група – тварини із імунодепресією, (n=11); 5 група – тварини із імунодепресією та застосуванням ЕЕТП 9, (n=11); 6 група – тварини із імунодепресією та застосуванням препарату порівняння, (n=11); ¹ – достовірно відносно інтактних тварин, $p \leq 0,05$; ² – достовірно відносно групи тварин із радіаційною імунодепресією, $p \leq 0,05$; ³ – достовірно відносно групи тварин із застосуванням препарату порівняння, $p \leq 0,05$

На 14-ту та 21-шу добу під впливом препарату порівняння у мишей із радіаційною імунодепресією реєструвалася достовірне підвищення коефіцієнта стимуляції у НСТ-тесті порівняно групою контролю. Не дивлячись на зареєстровані достовірно вищі рівні вказаного показника в період з 3-ої по 21-шу добу спостереження порівняно з групою тварин із імунодепресією, повне відновлення функціональної активності нейтрофілів відбулося лише на 31-шу добу експерименту. Таким чином, застосування ЕЕТП 9 підвищувало рівень коефіцієнту стимуляції в НСТ-тесті впродовж усього строку експериментального

спостереження із досягненням фізіологічного рівня на 21-шу добу спостереження, в той час коли за застосування препарату порівняння в умовах променевої імунодепресії коефіцієнт стимуляції в НСТ-тесті був в 1,2 раза нижчим від зареєстрованого в групі інтактних тварин, а досяг її рівня лише на 31-шу добу експерименту.

У тварин із радіаційною імунодепресією реєструється зменшення вмісту катіонних білків в нейтрофілах периферичної крові. Особливого зниження він зазнав на 3-тю та 7-му добу спостереження, (рис. 6.5).

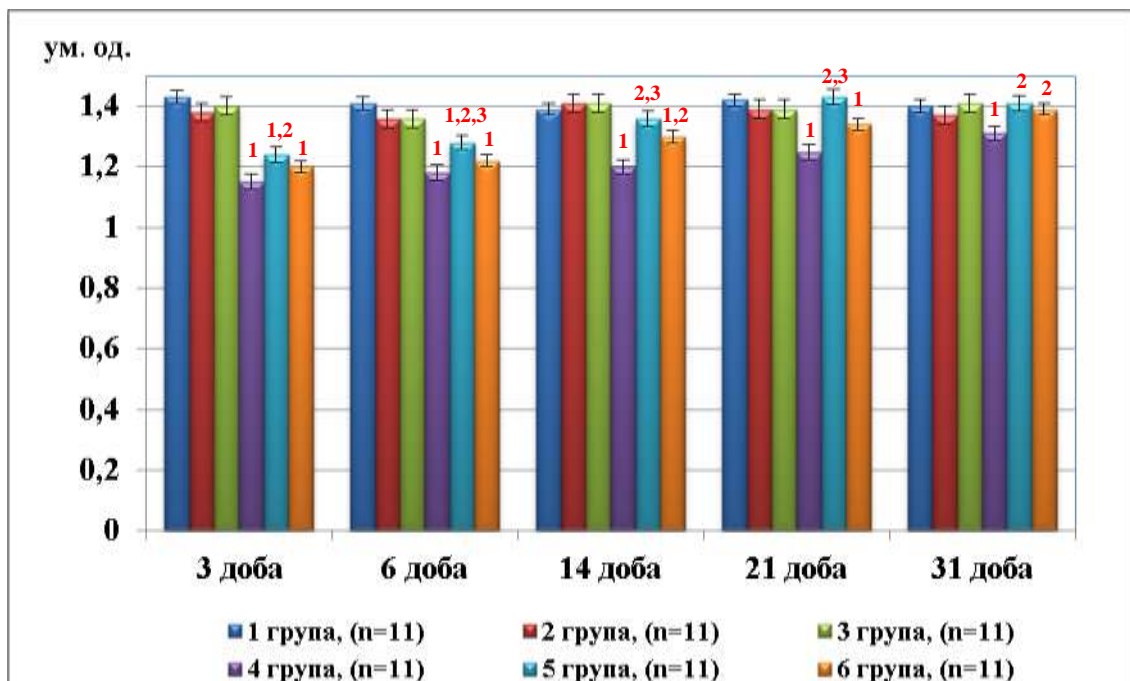


Рис. 6.5. Рівень катіонних білків в нейтрофілах периферичної крові мишей із радіаційною імунодепресією під впливом ЕЕТП 9, ум. од.: 1 група – інтактні тварини, (n=11); 2 група – тварини із застосуванням ЕЕТП 9, (n=11); 3 група – тварини із застосуванням препарату порівняння, (n=11); 4 група – тварини із імунодепресією, (n=11); 5 група – тварини із імунодепресією та застосуванням ЕЕТП 9, (n=11); 6 група – тварини із імунодепресією та застосуванням препарату порівняння, (n=11);
¹ – достовірно відносно інтактних тварин, $p \leq 0,05$; ² – достовірно відносно групи тварин із радіаційною імунодепресією, $p \leq 0,05$;
³ – достовірно відносно групи тварин із застосуванням препарату порівняння, $p \leq 0,05$

Рівень катіонних білків у нейтрофілах крові тварин із імунодепресією не досягав нормальних значень і на 31-шу добу спостереження, але мав тенденцію до нормалізації.

Під впливом ЕЕТП 9 спостерігалось значно менше радіаційно-індуковане зниження рівня показника лізосомально-катіонного тесту. На 3-тю та 7-му добу у мишей даної групи він перевищував показники у тварин із імунодепресією в 1,2 раза, а на 14-ту добу не мав достовірних відмінностей від значень у інтактних тварин.

У разі застосування «Ербісол» вміст катіонних білків в нейтрофілах периферичної крові був достовірно вищим порівняно з групою тварин із імунодепресією починаючи лише з 21-ої доби, саме тоді він і набув нормальних значень, що були зареєстровані у групи інтактних тварин.

Активність мієлопероксидази в нейтрофілах периферичної крові дослідних тварин в рані строки після індукції імунодепресії була зниженою. Найбільше пригнічення активності досліджуваного ферменту було зареєстровано на 7-му добу спостереження, коли її рівень був в 1,6 разів нижче від значень в групі інтактних тварин. Вірогідна відмінність активності МПО у тварин із імунодепресією від її рівня у інтактних тварин не зникла до кінця терміну спостереження.

Застосування ЕЕТП 9 мишам із імунодепресією сприяло прискоренню нормалізації активності мієлопероксидази вже з 3-ої доби від початку спостереження.

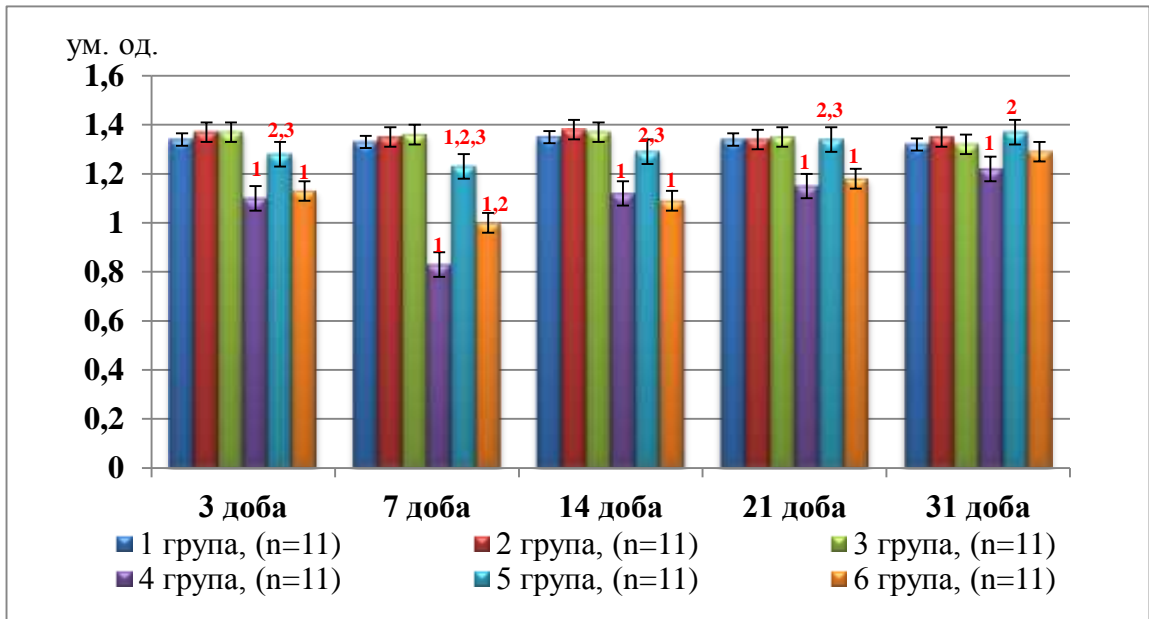


Рис. 6.6 Динаміка активності мієлопероксидази в нейтрофілах периферичної крові мишей із радіаційною імунодепресією під впливом ЕЕТП 9, ум. од.: 1 група – інтактні тварини, (n=11); 2 група – тварини із застосуванням ЕЕТП 9, (n=11); 3 група – тварини із застосуванням препарату порівняння, (n=11); 4 група – тварини із імунодепресією, (n=11); 5 група – тварини із імунодепресією та застосуванням ЕЕТП 9, (n=11); 6 група – тварини із імунодепресією та застосуванням препарату порівняння, (n=11); ¹⁾ – достовірно відносно інтактних тварин, $p \leq 0,05$; ²⁾ – достовірно відносно групи тварин із радіаційною імунодепресією, $p \leq 0,05$; ³⁾ – достовірно відносно групи тварин із застосуванням препарату порівняння, $p \leq 0,05$.

На 14-ту добу спостереження в нейтрофілах тварин, які отримували ЕЕТП 9, відбувалося повне відновлення активності МПО, в той час як у тварин із імунодепресією нормалізації активності цього ферменту не відбулося за означений строк експерименту (31 доба).

За застосування препарату порівняння активність МПО достовірно переважала над активністю цього ферменту у тварин із імунодепресією на 7-му

добу спостереження. Нормалізація даного показника у тварин із імунодепресією, що отримували препарат порівняння відбулася лише на 31-шу добу експерименту.

Променевий вплив мав наслідком зниження активності лужної фосфатази, що було вираженим на 7-му добу спостереження, де її значення були нижчими від інтактних на 20 %. За застосування ЕЕТП 9 впродовж першого тижня після ушкоджуючого впливу достовірного зниження цього показника не спостерігалось.

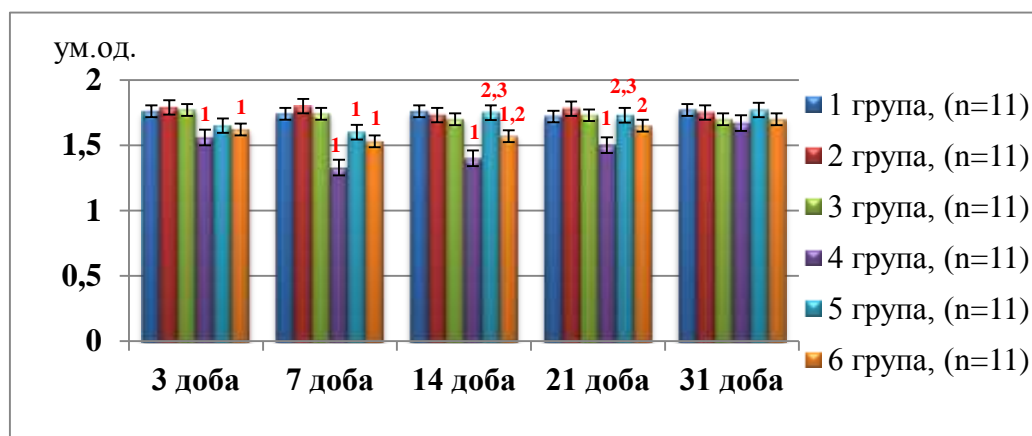


Рис. 6.7 Динаміка активності лужної фосфатази нейтрофілів периферичної крові тварин із радіаційною імунодепресією під впливом ЕЕТП 9, ум. од.: 1 група – інтактні тварини, (n=11); 2 група – тварини із застосуванням ЕЕТП 9, (n=11); 3 група – тварини із застосуванням препарату порівняння, (n=11); 4 група – тварини із імунодепресією, (n=11); 5 група – тварини із імунодепресією та застосуванням ЕЕТП 9, (n=11); 6 група – тварини із імунодепресією та застосуванням препарату порівняння, (n=11); ¹⁾ – достовірно відносно інтактних тварин, $p \leq 0,05$; ²⁾ – достовірно відносно групи тварин із радіаційною імунодепресією, $p \leq 0,05$; ³⁾ – достовірно відносно групи тварин із застосуванням препарату порівняння, $p \leq 0,05$.

Так, за застосування ЕЕТП 9 на 3-тю добу активність ЛФ була зниженою лише на 4 % порівняно з інтактними тваринами.

На 7-му добу за дії ЕЕТП 9 активність ЛФ була достовірно вищою ніж у групи тварин із імунодепресією, але поряд із цим була зниженою порівняно з інтактними тваринами ($p \leq 0,05$).

На 14-ту добу у мишей із імунодепресією за застосування ЕЕТП 9 рівень ЛФ досяг нормальних значень, чого не було зареєстровано у тварин без його застосування, де активність ЛФ була зниженою на 17 % порівняно із групою інтактних тварин.

Застосування препарату порівняння мишам із імунодепресією не викликало подібного до ЕЕТП 9 ефекту, а саме швидкість відновлення активності лужної фосфатази була меншою, хоча і мала достовірну різницю із значеннями у групи контролю з 7-ої по 21-шу добу спостереження. Активність даного ферменту у групи мишей із імунодепресією за застосування препарату порівняння співпадала із показниками у інтактній групі лише на 21-шу добу експерименту.

6.4 Рівень продуктів перекисного окиснення ліпідів у кістковому мозку мишей із індукованою імунодепресією під впливом ЕЕТП 9

Радіаційно-індукована імунодепресія супроводжується патологічними змінами стану окиснювальних процесів в організмі.

На 7-му добу зареєстровано зниження продуктів ПОЛ у тварин із радіаційною імунодепресією в порівнянні з 1-ою добою післяпроменевого періоду. Що, можливо, пояснюється проявом власне захисних реакцій організму на пошкоджуючий вплив. Однак у динаміці спостерігається особливе підвищення вторинних продуктів ПОЛ, а саме ТБК-реагуючих продуктів у кістковому мозку тварин цієї групи.

В результаті дослідження процесів ПОЛ у каріоцитах мишей, що отримували ЕЕТП 9 було виявлено достовірно нижчі рівні його продуктів вже на 1-шу добу дослідження на 27,5 % для ДК, на 29 % для ТК та на 28,8 % для ТБК-реагуючих продуктів порівняно з тваринами із імунодепресією (табл. 6.2).

Подібна картина, а саме зниження інтенсивності пероксидації ліпідів у кістковому мозку за застосування ЕЕТП 9, простежується і у динаміці - на 7-му та 14-ту добу спостереження. Так, у тварин цієї групи на 7-му добу рівень ДК знизився на 23 %, ТК – на 26,7 % та ТБК-реагуючих продуктів – на 30,2 %, на 14-ту добу – на 38 %, 46 % та 46,2 % відповідно, що фактично привело їх до фізіологічних значень. Отримані дані свідчать про те, що застосування ЕЕТП 9 мишам із індукованою імунодепресією викликає інгібіцію процесів ПОЛ у кістковому мозку, що формує підґрунтя для відновлення функціонування гемопоетичної системи (табл. 6.2).

Таблиця 6.2

Рівень первинних та вторинних продуктів перекисного окиснення ліпідів ККМ у мишей із імунодепресією за застосування ЕЕТП 9, (M±σ, n=11)

Групи тварин		Показники		
		ДК, (нМ/10 ⁶ кл)	ТК, (нМ/10 ⁶ кл)	ТБК-реагуючі продукти, (нМ/10 ⁶ кл)
1 доба	1 група	0,36±0,02	0,26±0,029	0,29±0,03
	2 група	0,38±0,03	0,27±0,020	0,28±0,022
	3 група	0,33±0,02	0,24±0,030	0,25±0,017
	4 група	0,58±0,052 ¹	0,48±0,039 ¹	0,45±0,034 ¹
	5 група	0,42±0,054 ^{1,2}	0,34±0,040 ^{1,2}	0,32±0,042 ^{1,2}
	6 група	0,40±0,039 ^{1,2}	0,38±0,044 ^{1,2}	0,35±0,037 ^{1,2}
7 доба	1 група	0,34±0,025	0,24±0,023	0,28±0,021
	2 група	0,35±0,024	0,25±0,021	0,29±0,032
	3 група	0,39±0,03	0,28±0,027	0,24±0,024
	4 група	0,52±0,050 ¹	0,45±0,031 ¹	0,43±0,040 ¹
	5 група	0,40±0,049 ^{1,2}	0,33±0,030 ^{1,2}	0,30±0,042 ²
	6 група	0,39±0,046 ^{1,2}	0,31±0,029 ^{1,2}	0,32±0,037 ²
14 доба	1 група	0,36±0,020	0,26±0,029	0,29±0,03
	2 група	0,37±0,028	0,27±0,024	0,27±0,028
	3 група	0,33±0,019	0,24±0,020	0,23±0,021
	4 група	0,61±0,050 ¹	0,55±0,041 ¹	0,65±0,047 ¹
	5 група	0,38±0,047 ^{2,3}	0,30±0,039 ^{2,3}	0,35±0,031 ^{2,3}
	6 група	0,49±0,041 ^{1,2}	0,43±0,042 ^{1,2}	0,46±0,045 ^{1,2}
21 доба	1 група	0,33±0,024	0,25±0,021	0,27±0,044
	2 група	0,35±0,030	0,22±0,030	0,30±0,048
	3 група	0,30±0,028	0,27±0,024	0,25±0,040
	4 група	0,45±0,059 ¹	0,50±0,047 ¹	0,55±0,041 ¹
	5 група	0,36±0,032 ²	0,29±0,030 ²	0,31±0,048 ²
	6 група	0,39±0,032 ²	0,30±0,031 ²	0,29±0,049 ²

1 група – інтактні тварини; 2 група – тварини із застосуванням ЕЕТП 9; 3 група – тварини із застосуванням препарату порівняння; 4 група – тварини із імунодепресією; 5 група – тварини із імунодепресією та застосуванням ЕЕТП 9; 6 група – тварини із імунодепресією та застосуванням препарату порівняння; ¹ – достовірно відносно інтактних тварин, $p \leq 0,05$; ² – достовірно відносно групи тварин із імунодепресією, $p \leq 0,05$; ³ – достовірно відносно групи тварин із застосуванням препарату порівняння, $p \leq 0,05$

Застосування препарату порівняння також здійснювало антирадикальний ефект за показниками рівнів ДК, ТК та ТБК-реагуючих продуктів у каріюцитах КМ починаючи з 1-ої доби реєстрації. Так у тварин цієї групи на 1-шу добу рівень ДК знизився на 31 %, ТК – на 21 %, та ТБК-реагуючих продуктів – на 22 %, на 7-му добу – на рівень ДК знизився на 25 %, ТК – на 31 %, та ТБК-реагуючих продуктів – на 26 %. На 14-ту добу рівні продуктів пероксидації ліпідів за застосування препарату порівняння хоча і були нижчими по відношенню до групи контролю: ДК – на 20 %, ТК – на 22 %, ТБК-реагуючих продуктів – на 30 %, але все ще були суттєво вищими за фізіологічні рівні, зареєстровані в групі інтактних тварин: ДК – на 36 %, ТК – на 65 %, ТБК-реагуючих продуктів – на 58 %, в той час, коли, як вже зазначалося, у групі тварин із імунодепресією, яким застосовували ЕЕТП 9 було відзначено нормалізацію цих показників [165].

АНАЛІЗ ТА УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ

Проведені дослідження демонструють, що застосування екстракту з ембріональних тканин птахів 9-ти діб розвитку при радіаційно-індукованій гемоста імунодепресії призводить до інтенсифікації реконституції процесів кровотворення та відновлення функціональної активності імунокомпетентних клітин та клітин вродженого імунітету вже у ранні строки після експериментального ушкодження, здійснює імуномодуляторний вплив на продукцію гемопоетичних цитокінів у кістковому мозку та цитокінів – регуляторів імуногенезу у сироватці крові. Зареєстровані біологічні ефекти, ймовірно, обумовлені регуляторною, протекторною та відновлювальною дією конститuentів досліджуваної субстанції на клітини та органи гемопоетичної та імунної систем.

В рамках дослідження складу ЕЕТП 9 показано, що серед амінокислот в гідролізаті переважають аргінін ($17,25 \pm 0,76$) мг/100 мл, фенілаланін ($17,81 \pm 0,52$) мг/100 мл, а також тирозин ($9,45 \pm 0,22$) мг/100 мл і лейцин ($8,17 \pm 0,23$) мг/100 мл. Серед жирних кислот в жиророзчинній фракції домінують за кількісним вмістом олеїнова ($8,18 \pm 0,40$) мг/100 мг, пальмітинова ($4,56 \pm 0,28$) мг/100 мг, лінолева ($2,49 \pm 0,11$) мг/100 мг і стеаринова кислоти ($1,76 \pm 0,09$) мг/100 мг (рис. 3.1, 3.2).

Отримані нами дані перекликаються із дослідженням зарубіжних вчених, що встановили у складі екстракту з курячих ембріонів присутність лінолевої (1,3 %), пальмітинової (32,1 %), арахідонової (2,2 %), пальмітолеїнової (2,8 %), стеаринової (9,5 %), олеїнової (39,9 %) жирних кислот та підкреслили превалювання відсотку поліненасичених жирних кислот у його складі. Автори, посилаючись на відомості щодо здатності поліненасичених жирних кислот модулювати імунологічні реакції та стимулювати репаративні процеси *in vivo*, зробили припущення, що саме присутність цих біомолекул обумовлює імуномодуляторну дію екстракту з курячих ембріонів, що була досліджена *in vitro* [18].

В роботі інших китайських вчених показано превалювання серед амінокислот гідролізату курячих ембріонів 6 – 11 діб розвитку фенілаланіну, тирозину, аргініну та лізину [131]. В даній роботі також порівняно активність екстракту з ембріонів курей різних строків розвитку (6-ти, 11-ти, 14-ти та 18-ти діб) щодо здатності до нейтралізації таких вільних радикалів як DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl), ABTS(+) (2,2'-Azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonate)) радикал та гідроксил радикал. Дані властивості були зареєстровані для всіх строків інкубації. Найбільшу активність проявляли екстракти з найбільшою кількістю гідрофобних амінокислот – фенілаланіну та лейцину, а також так званих антиоксидантних амінокислот – аргініну, тирозину, лізину, глютамінової кислоти.

Відому значну роль амінокислот та жирних кислот у метаболізмі імунікомпетентних клітин та регуляції функціонування неспецифічної та специфічної ланок імунної системи складно безпосередньо пов'язувати із отриманими у нашій роботі біологічними ефектами від застосування ЕЕПТ 9, оскільки, нами було визначено не вільний їх репертуар. Визначені амінокислоти та жирні кислоти у складі ЕЕПТ 9 є, звичайно, складовими мономерами складних функціонально активних молекулярних структур, що виконують певні ролі в процесі ембріонального генезу.

У разі, якщо припустити надходження із ЕЕПТ 9 до організму вільних аміно- та жирних кислот, можна звернути уваги на чисельні вже отримані наукові дані, щодо імунотуляторної ролі цих біомолекул щодо формування ефективної адаптивної імунної відповіді, стимулятор них ефектів по відношенню до неспецифічної резистентності та виражених антиоксидантних ефектів. Так, встановлено, що аспарагінова та глютамінова кислоти чинять виражений імуностимулювальний ефект. Аргінін, лейцин, лізин, гліцин і аланін підвищують неспецифічну резистентність, підвищують рівень лейкоцитів, в тому числі Т- і В-лімфоцитів, а також стимулюють лізоцимну, бактерицидну та фагоцитарну активність крові та, як наслідок, сприяють зниженню захворюваності, а у разі такої скорочують тривалість її перебігу в експерименті [191, 192]. Для L-аргініну

встановлені багатосторонні зв'язки з імунологічною реактивністю, зумовлені фізіологічними ефектами утворення з амінокислоти оксиду азоту, який є здатним до імуномодулюючого впливу і може виступати в якості одного з основних ефекторів клітинного імунітету, надаючи антимікробні, протипухлинні, радіозахисні та антипроліферативні ефекти [193]. Серед жирних кислот найбільш вираженим впливом на формування ефективної імунної відповіді на антигени різного походження володіють незамінні поліненасичені жирні кислоти (ПНЖК): лінолева, ліноленова і арахідонова. Є дані про аналогічну дію олеїнової кислоти [194], що справляють свої ефекти шляхом збільшення проліферативної відповіді Т- та В-лімфоцитів. Певні дослідження вказують на існування позитивної кореляції між рівнем ПНЖК в крові та показниками імунологічної реактивності, а саме з балансом субпопуляційного складу лімфоцитів ($CD20^+$ і $CD25^+$), проліферативною здатністю лімфоцитів і продукцією імуноглобулінів, що підкреслює значну роль жирних кислот в цілому в регуляції імунної відповіді [195].

Так, окремо нами встановлено присутність у складі ембріонального екстракту основного фактору росту фібробластів (120 нг/мл), що його роль є відомою як основного ендо- та паракринного регулятора ембріонального морфогенезу, постембріональної диференціації, проліферації, вітальності та міграції клітин різних типів, зокрема ГКС [55, 60]. Ключовим є його властивість викликати синтез G-CSF, IL-6, IL-8, що відбувається через активацію ендотеліальних клітин в кістковому мозку. Звідси, дефекти, що пов'язані з пригніченням функції FGFb, призводять до зниження виживаності кровотворних клітин, а також порушення процесів формування їх колоній [60]. В роботі зарубіжних авторів продемонстровано, що сигналінг через FGFb сприяє росту *in vitro* ГСК та прогеніторних СК, а також досліджено експресію FGFR1 та його функції у сприянні росту прогеніторних СК *in vivo*. Дане дослідження вперше показує, що FGF-сигналінг полегшує відновлення пошкодженої фторурацилом

системи гемопоезу у мишей шляхом активації проліферації та сприяння мобілізації прогеніторних ГСК *in vivo* [62].

Наведені факти дають натяк на можливе пояснення механізмів біологічної дії екстракту з ембріональних тканин птахів 9-ти діб розвитку, з огляду на присутність bFGF у його складі.

В ході дослідження імуотропних властивостей екстракту з ембріональних тканин птахів 9-ти діб розвитку, що застосовувався на моделі радіаційної імунодепресії на мишах показано відновлювальні та імуномодулюючі його властивості, які відображаються на декількох рівнях організації кровотворної та імунної систем.

За дослідження впливу ЕЕТП 9 на морфологічний стан органів імунної системи було показано принципові його відмінності у порівнянні з контролем.

Багаточисельні дослідження присвячені стану гемопоетичних органів в умовах радіаційно-індукованої імунодепресії демонструють дані щодо гіпоплазії і навіть хронічній аплазії із заміщенням кісткового мозку жирОВОЮ й фіброзною тканинами в залежності від інтенсивності дії вказаного фактору [196].

Спільною рисою в характері стану кісткового мозку, селезінки та тимусу мишей із імунодепресією за умови застосування ЕЕТП 9 було достовірне підвищення абсолютного числа каріоцитів цих органів у порівнянні з контролем, де спостерігалось на 7-му добу дослідження клітинне спустошення без повноцінного відновлення на 14-ту добу експерименту.

Також, за дослідження стану лімфоїдного компартменту КМ було показано, що застосування ЕЕТП 9 сприяє в більш короткий термін відновленню відносного числа В-лімфоцитів різного ступеню зрілості – $\text{с}\mu^+\text{с}\mu^-$, $\text{с}\mu^+$ -клітин та Т-лімфоцитів з рецептором CD 90.2⁺ (Thy 1).

Відносне число $\text{с}\mu^+\text{с}\mu^-$ -клітин та $\text{с}\mu^+$ -клітин у мишей із індукованою імунодепресією за застосування ЕЕТП 9 набувало фізіологічного співвідношення на 14-ту добу спостереження, в той час коли у мишей із застосуванням препарату порівняння відносна кількість цих клітин була у 1,7 та 1,8 раза нижчою у

порівнянні із інтактними тваринами. Нормалізація відносного числа CD90.2⁺-клітин у КМ тварин із імунодепресією у разі використання ЕЕТП 9 та препарату порівняння відбулася синхронно, а саме на 7-му добу, чого не вдалося зареєструвати без застосування будь-яких реконститутивних засобів.

При цьому, гістологічне дослідження показувало, що застосування ЕЕТП 9 дозволило попередити розвиток важкої гіпоплазії кісткового мозку та розширення і зменшення кістковомозкових синусоїдів в КМ. На відміну від контролю, в кістковій тканині тварин даної групи виявлено велику кількість остеобластів – регуляторів процесів остеогенезу і гемопоезу, що свідчить про ініціювання остеогенезу і процесів кровотворення в КМ тварин із радіаційною імунодепресією. Відомо, що остеобласти секретують цитокіни, які стимулюють проліферацію СКК. У той же час вони продукують в міжклітинній матрикс білок остепонтін, що є зворотним регулятором чисельності СКК [84, 197], тому збільшення шару остеобластів у кістковій тканині під впливом ЕЕТП 9 є маркером нормального перебігу регенеративних процесів. Коли доведено, що стромальні дефекти можуть відігравати ключову роль у розвитку гемобластозів, включаючи захворювання, обумовлені малігнізацією гемолімфопоезу [174, 177, 198]. Також є свідчення про можливість підвищення вмісту ГКС в КМ шляхом стимуляції кісткоутворення (задля підвищення кількості остеобластів), що є важливим перед заходами терапевтичної мобілізації ГСК після хіміотерапії та радіотерапії у онкологічних хворих [84, 199].

Застосування ЕЕТП 9 вже на 7-му добу дослідження, на відміну від групи контролю попереджало порушення кровопостачання селезінки. Розміри лімфатичних фолікулів, з добре диференційованими гермінативними центрами відповідали нормі, коли у групі контролю констатовано значне збільшення числа гермінативних центрів (рис. 3.11). Також було відзначено зменшення щільності клітин в фолікулах селезінки, яке пов'язане із збільшенням кількості макрофагів і бластних форм, що мають великий обсяг цитоплазми. Зрушення співвідношення білої і червоної пульпи в бік білої було виражено не настільки, як зазначено у

контрольній групі. Більшою була кількість гранулоцитів і мегакаріоцитів в білій пульпі селезінки у тварин даної групи, коли у групі контролю кількість гранулоцитів значно знижувалася в порівнянні з нормою. У маргінальній зоні фолікулів відзначено велику кількість мегакаріоцитів та нейтрофілів, чого не спостерігалось у контролі (рис. 3.12). За застосування ЕЕТП 9 на 14-ту добу експерименту некротичних змін тканинних елементів та розростання сполучнотканинних тяжів подібних до групи порівняння зареєстровано не було. Клітини сполучної тканини не мали візуальних відмінностей від мишей інтактної групи. Спостерігалася також нормалізація співвідношення білої та червоної пульпи органу, коли на цю добу спостереження у тварин групи порівняння спостерігалось переважання білої пульпи, а червона пульпа, що займала відносно невелику площу, містила безліч гемокапілярів (рис. 3.12). А, як відомо, виражена гіперплазія білої пульпи може призводити до затримки дозрівання Т- і В-популяцій лімфоцитів, та появи незрілих форм клітин, що може призводити до диспродукції імуноглобулінів (зниження продукції імуноглобуліну G) [202].

За гістологічного дослідження тимусу мишей із радіаційною імунодепресією із застосуванням ЕЕТП 9 на 7-му добу експерименту спостерігали лише незначне порушення кровопостачання органу. В гістологічних препаратах тимусу даної групи тварин відзначено збільшення зони коркової речовини. Чітко диференціювалася межа між корковою й мозковою зонами, й епітеліальний мережевий остов залози. Необхідно зазначити той факт, що в тимусі даної групи тварин виявлялися регенераційні процеси, про що свідчить активна проліферація лімфобластів й менша кількість тілець Гассаля в середній частині мозкової речовини у порівнянні зі зразками, що були отримані від імунодепресованих тварин (рис. 3.14). при цьому за застосування ЕЕТП 9 динаміка відновлення абсолютного числа каріоцитів тимусу не була двохфазною, що було притаманним групі контролю, у тварин якої спостерігалось вторинна атрофія тимусу. Таким чином, раннє відновлення морфологічного стану та, зокрема, клітинності тимусу за застосування ЕЕТП 9 є вкрай важливими оскільки, як відомо, від повноцінності

його функціонування залежить швидкість та ефективність відновлення субпопуляцій Т-лімфоцитів та пов'язаних із ними імунних реакцій. Ранні строки відновлення клітинності органу можливо пов'язати із здатністю ЕЕТП 9 до підтримки клітин-попередників Т-лімфоцитів, що перешкоджає вичерпанню їх резервів для відновлення органу та формує вторинну атрофію у групі контролю. Можливо також під впливом ЕЕТП 9 відбувається посилення міграції та згодом проліферативної активності кістково-мозкових попередників Т-лімфоцитів, стимулюючи цим відновлення тимусу за рахунок нормальних процесів тимопоезу.

Вкрай важливим є імуномодулюючий вплив ЕЕТП 9, виражений у багаторазовому підвищенні рівнів ІЛ-6 та G-CSF та зниженні рівня Flt3-ліганд у кістковому мозку тварин у ранні строки після індукції радіаційної імунодепресії із нормалізацією їх рівнів вже на 7-му добу спостереження. У групи із імунодепресією в ранні строки також спостерігалася певна стимуляція синтезу даних цитокінів, однак після 3-ої доби і до кінця терміну спостереження рівні ІЛ-6 та G-CSF були вище фізіологічних, а рівень Flt3-ligand зазнав достовірного зниження. Суміжні дані щодо стимуляції синтезу ІЛ-6 та Flt3-ligand, що відбувається не безпосередньо іонізуючим випромінюванням, а дією інших цитокінів, у сироватці крові мишей із радіаційною аплазією отримані у низці зарубіжних експериментальних робіт [203, 204].

Синтез досліджених гемопоетичних факторів є тканинспецифічним, а його динамічні зміни – прогностичним показником тривалості перебігу та тяжкості радіаційних імунодепресивних уражень [205, 206].

Відомо, що G-CSF, як продукт ГІМ, стимулює проліферацію і диференціювання клітин-попередників у зрілі нейтрофіли, підвищує їх виживаність та функціональну активність й забезпечує підтримку гемопоезу, що з деяким успіхом використовується при подоланні хіміотерапевтичної нейтропенії, трансплантації кісткового мозку, тяжкій хронічній нейтропенії, мієлодиспластичному синдромі, тяжкій апластичній анемії, й мобілізації клітин-попередників периферичної крові для трансплантації [207–209]. В роботах деяких

авторів показано, що саме підвищення синтезу G-CSF на фоні застосування певних лікарських засобів є підґрунтям для більшої виживаності тварин в експерименті в ході подолання хіміотерапевтичного та іншого видів ушкоджень кровотворення [207]. Також важливою у цьому контексті є здатність G-CSF впливати на рівень формування активних форм кисню, шляхом зниження продукції вільних радикалів пошкодженими клітинами, що їх роль у ланцюговому пошкодженні клітин є добре відомою. А також встановлено його здатність до зниження рівня радіаційно-індукованого апоптозу, збереження мембранного потенціалу мітохондрій та здатність до підвищення кількості самих мітохондрій в клітинах, що є чутливими до G-CSF в умовах ушкоджуючого радіаційного імунопатологічного впливу [208–212].

Flt-3-ліганд регулює антигеннезалежний лімфопоез, виступає раннім гемопоетичним цитокіном, який має першорядне значення для проліферації кровотворних клітин-попередників мієлоїдного (зокрема, для дендритних клітин) [213], В- та Т-лімфоїдного диферонів. У синергізмі з іншими гемопоетичними факторами відповідає за стимуляцію проліферації стовбурових ($CD34^+$) та прогеніторних клітин. В експерименті з моделювання аплазії кісткового мозку на мишах показано, що зміна концентрації Flt3-ligand, що супроводжує цей патологічний процес, відбувається однаковою мірою в тканинах таких органів, як тимус, селезінка, кістковий мозок, печінка, головний мозок та кров. Також показано, що його концентрація є чітким відображенням функціонального стану кісткового мозку [214]. На даному етапі детекція його рівня використовується для біоіндикації раннього пошкодження цього органу [215], оскільки вона корелює з тяжкістю радіаційно-асоційованої аплазії кісткового мозку і варіації його рівня можуть бути використані в якості прогностичного критерію аплазії за вказаної патології [207].

Як відомо, плейотропність ІЛ-6 включає в себе як його про-, так і антизапальні властивості. Так, його підвищення, опосередковане підвищенням ІЛ-1 та TNF- α , в ранніх строках після ушкоджуючого впливу, вважається реалізує

його антизапальні властивості, котрі спрямовані на протидію ушкоджуючій дії прозапальних цитокінів і захищає організм [217, 218]. Також, як відомо, ІЛ-6 виступає в ролі стимулятора проліферації та диференціації ліній мієло- й лімфопоезу, та стимулятора росту мезенхімальних прекурсорів [219] та займає не останнє місце у радіозахисній системі організму. У разі затяжної гіперпродукції, як ми спостерігаємо у тварин із радіаційною імунодепресією, ІЛ-6 стає посередником пригнічення його реконструкції, гальмуючи проліферацію та розповсюдження клітин строми КМ, що значно дезорганізує необхідне для нормального кровотворення гемопоетичне мікрооточення. В якості основного компоненту ГІМ, клітини строми КМ оточуючи гемопоетичні стовбурові клітини, підтримують і регулюють внутрішнє середовище для стабілізації, диференціації, проліферації й дозрівання гемопоетичних клітин прекурсорів, а також секретують безліч цитокінів – регуляторів гемопоезу. Тому, дефекти строми клітин кісткового мозку, ймовірно, опосередковані антизапальними властивостями ІЛ-6, можуть призвести до поглиблення пострадіаційної кризи гемопоетичної функції КМ [220]. Подібна картина, можливо, й створює плацдарм для цитокінової дезрегуляції за самостійного відновлення пострадіаційних ушкоджень гемо- та імуногенезу у тварин, котрим не застосовували ре конститутивні засоби.

Різноманітність характеру пострадіаційного підйому рівнів вказаних цитокінів пояснюється відмінностями у регуляції їх синтезу, а також, ймовірно, залежить від того, чи впливає пошкоджуючий вплив даного виду безпосередньо на рівень їх синтезу, або ж він змінюється внаслідок радіаційно-опосередкованого впливу на інші цитокіни, які є елементами регуляторної ланки синтезу гемопоетичних факторів, що розглядаються. До клітин-продуцентів вказаних цитокінів належать фактично усі клітинні елементи ГІМ: макрофаги, стромальні механоцити, ендотеліоцити, адипоцити, тощо, що відповідають за нормальний стан та перебіг конститутивного гемопоезу. Отже, безпосередній або ж каскадно-опосередкований підйом, що відбувся, безумовно, характеризує інтенсивність перебігу наслідків ушкоджуючого впливу, та свідчить про зміну функціонального

стану головних клітинних елементів, які забезпечують нормальний гемопоез. Тоді, як за умови нормального перебігу процесу кровотворення рівні G-CSF та IL-6 в супернатанті клітин КМ складають лише декілька пікограмів із характерними піками синтезу після впливу фізіологічних стимулюючих сигналів – 3-4 години [212].

Отже, імуномодуляторний вплив застосування ЕЕТП 9 у мишей із радіаційною імунодепресією на рівні G-CSF, IL-6 та Flt3-ligand в супернатанті КМ, культивованих *in vitro*, розглядається нами як суттєвий компонент наступного відновлення порушеного гемопоезу, що базується на здатності цих гемопоетичних цитокінів до індукції проліферації стовбурових клітин та гемопоетичних прекурсорів й їх подальшої диференціації, а також до стимуляції регенерації після радіаційно-індукованої мієлосупресії.

Отримані імуномодуляторні ефекти ми відносимо на рахунок здатності FGFb, що входить до складу ЕЕТП 9, регулювати активність стромальних клітин КМ. А, як припускають, FGFb грає центральну роль в регулюванні проліферації й диференціюванні клітин КМ *in vivo* та *in vitro*. FGFb не тільки безпосередньо стимулює проліферацію кровотворних клітин та клітин строми КМ, а і опосередковано модулює продукцію різноманітних цитокінів його строми. А також достовірно показано, здатність FGF2 до протекції кровотворної тканини мишей певних ліній від ушкоджуючого впливу іонізуючого випромінювання [221].

Таким чином, застосування ЕЕТП 9 завдяки стимуляції в перші години після імунодепресуючого впливу спектру позитивних регуляторів гемопоезу, рівні котрих вимірювались в супернатанті клітин кісткового мозку, культивованих *in vitro*, сприяє успішному та більш швидкому відновленню гемопоезу, що створює у свою чергу передумови для ефективного імуногенезу.

Шляхом застосування ЕЕТП 9 вдалося запобігти, на відміну від групи контролю, явища панцитопенії у циркуляторному руслі, що її роль у розвитку імунодепресії підкреслюється в численних літературних джерелах. Масова загибель клітин периферичної крові і, як наслідок, дефіцит лейкоцитів, із

підкріпленням гематологічної кризи шляхом затримки проліферації гемопоетичних попередників цілком закономірно описується як підгрунття імунодепресії [222].

Крім того, імуносупресія, як відомо, є одним з основних наслідків радіаційно-індукованого запуску запальних процесів, регульованих низкою цитокінів та медіаторів сироватки крові [223].

Так, у мишей із застосуванням ЕЕТП 9 відбувалась більш швидка нормалізація рівнів сироваткових цитокінів: ІЛ-1 β , ІЛ-6 та ІЛ-4. Коли у тварин із радіаційною імунодепресією в динаміці 31-єї доби спостереження було відмічено зтяжне підвищення їх рівнів.

Наведені цитокіни задіяні в стимуляції проліферації, диференціації і функціональній активації імунокомпетентних клітин і є позитивними регуляторами гемопоезу. Відомою також є їх роль у забезпеченні виживаності тварин після дії критичних доз імунодепресуючого радіаційного випромінювання [179]. Так, посилення в ранні строки після опромінення синтезу деяких цитокінів (ІЛ-1 β і ІЛ-6 в їх числі) служить одним з важливих "компонентів" протирадіаційного захисту організму. Протекторна дія ІЛ-1 реалізується за участю ІЛ-6 [182]. ІЛ-4 опосередковує процеси дозрівання, активації та антигенпрезентуючі функції дендритних клітин, які грають ключову роль у активації Т-клітинної ініціації формування адаптивного імунітету за радіаційного імунодепресуючого впливу [224]. Але ж саме надмірним та пролонгованим підвищенням ІЛ-4 (та де коли ІЛ-10) саме і опосередковується розвиток імунодепресії, який реалізується через порушення балансу між клітинними та гуморальними реакціями за рахунок гіперстимуляції «В-клітинного імунітету», що створює функціональний дефіцит захисту організму від зовнішньоклітинних збудників. У дослідних мишей дане безперечне переважання Т-клітинної ланки імунітету над «В-клітинною» базується на видовій особливості виключно антагоністичних взаємин своїх відповідних активаторів - Th1 та Th2 типів. У людини же, на відміну від мишей, за наявності Th0, котрі здатні секретувати одночасно і ІЛ-2, і ІЛ-4, і ІFN- γ повного

антагонізму цих ланок не спостерігається. Переважання активності Th1 над Th2 у людини залежить від секреції цитокінів також макрофагами та іншими лімфоцитами [26]. Однак, все одно, збереження нормальної пропорції активації Th1 та Th2 типів за рахунок впливу на синтез відповідних цитокінів є запорукою збереження фізіологічної готовності організму до потенційної боротьби із патогеном конкретного типу, особливо при умові імуносупресивних впливів.

При застосуванні ЕЕТП 9 відбувається значне підвищення рівнів ІЛ-1 β і ІЛ-6 в сироватці крові в динаміці 1-ої доби після імунодепресуючого впливу, із стабілізацією, що реєструється вже на 7-му добу, виступаючи підґрунтям для повноцінної реалізації імунологічних реакцій. Характерним ефектом застосування ЕЕТП 9 за імунодепресії є стимуляція синтезу ІЛ-4, рівень якого збільшувався в кожній часовій точці дослідження в порівнянні з групою тварин, що не отримували екстракт, та стабілізацією на 7-му добу спостереження, коли рівень цього показника у тварин даної групи достовірно не відрізнявся від значень у інтактних тварин.

Важливість такого ефекту, як підвищення у ранні строки після ушкодження рівнів ІЛ-1 та ІЛ-6 під впливом застосування ЕЕТП 9 пояснюється їх імуно- та гемопоезпротекторними властивостями. Відомо, що ІЛ-1, посилюючи продукцію низки колонієстимулюючих факторів, активує стовбурові клітини, зокрема мієлоїдні СК, макрофагальні уніпотентні СК, гранулоцитарні уніпотентні СК, пре-Т-клітини, еозинофіли, на рівні кісткового мозку; активує нейтрофіли. Таким чином ІЛ-1 діє на мієлопоез і ранні етапи еритропоезу [26]. В експериментальних дослідженнях ІЛ-1 продемонстрував істотну роль в радіозахисному ефекті клітин мієлоїдного паростку і лімфоїдних попередників, що реалізується шляхом активації строми кісткового мозку. Імунологічний та гемопоетичний спектр активності ІЛ-1 визначається посиленням комітогенної проліферації, індукцією експресії рецептора до ІЛ-2, підвищенням синтезу та продукції ІЛ-4, -5, -6, активацією функції НК-клітин [225]. ІЛ-6 стимулює дозрівання В-лімфоцитів, Т-клітин, стимулює продукцію печінкою С-реактивного білку, також посилює

утворення супероксид радикалів [226]. Передусім, ІЛ-6 бере участь у реалізації запальної реакції і кровотворенні, *in vitro* він посилює утворення колоній усіх типів. ІЛ-6 не маючи самостійної радіозахисної дії, підвищує таку дію ІЛ-1. ІЛ-4 пригнічуючи функції макрофагів й секрецію ними ІЛ-1 та ІЛ-6, чинить протизапальну дію. Стимулює гемопоез, вступаючи в кооперацію з іншими чинниками. Зокрема, він сприяє виживаності кровотворних клітин [34].

Наведені факти щодо впливу ЕЕТП 9 на рівень цитокінів-регуляторів імунопоезу, вірогідно, і створюють умови для відновлення функціональної активності імункомпетентних клітин периферичної крові.

У разі введення ЕЕТП 9 мишам із імунодепресією функціональна активність Т-лімфоцитів нормалізувалася на 21-шу добу за показниками спонтанної та ФГА стимульованої бласттрансформації лімфоцитів, коли за дії «Ербісол» ще спостерігалось її зниження на 60 % та 66 % відповідно від фізіологічного рівня. У мишей без застосування будь-яких засобів ці показники були зниженими в 1,9 та 2,7 раза відповідно, а повне відновлення функцій цих клітин відбувалося лише на 31-шу добу.

Отримані нами експериментальні дані погоджуються із дослідженням зарубіжних вчених, в якому показано здатність екстракту з ембріонів курей стимулювати проліферацію лімфоцитів селезінки *in vitro* у мишей із імунодепресією. Так, продемонстровано, що сумісна преінкубація лімфоцитів, отриманих із селезінки мишей із викликаною імунодепресією, з ліпофільною фракцією екстракту у дозі 500 мг/мл підвищує проліферацію цих клітин на 78 % порівняно з контролем (миші із імунодепресією), перевищуючи навіть даний показник у групі позитивного контролю (мітоген Con A) [18].

Під дією ЕЕТП 9 вдалося спостерігати повноцінне формування адаптивного імунітету у експерименті з імунізації на 14-ту добу після індукції імунодепресії у мишей сезонною протигрипозною вакциною “Inflexal V. У нашому дослідженні ми спостерігали, що за імунізації “Inflexal V” мишей із імунодепресією середньо геометричний титр специфічних протигрипозних антитіл був вищим на 14-ту та

30-ту добу після імунізації, перевершуючи в 1,8 та 1,3 рази відповідно продукцію специфічних антитіл за умови застосування «Ербісол» та у 5,0 рази – у мишей без введення будь-яких засобів корекції імунодепресії.

У групи мишей із радіаційною імунодепресією спостерігається знижена здатність до антитілоутворення у відповідь на введення протигрипозної вакцини, що демонструє функціональну неспроможність, зокрема, ефекторів гуморальної імунної відповіді. Подібна картина може пояснюватись здатністю радіаційного фактору імунодепресії пригнічувати утворення плазматичними клітинами, регульоване Т-лімфоцитами Th1-типу, специфічних антитіл класу IgG субкласів 2a та 2b у відповідь на внутрішньоклітинні збудники [224].

Також, дефекти формування адаптивного імунітету підкріплюються пригніченням антигенпрезентуючих функцій дендритних клітин, а також опосередковані зниженням здатності ДК до активації Т-лімфоцитів (за рахунок підвищення ІЛ-2 та ІЛ-4), що є прикладом не досить успішної кооперації між цими клітинами, яка в нормі є основою створення імунологічної пам'яті. Можливим поясненням ефекту підвищення антитілоутворення за застосування ЕЕТП 9 у мишей із імунодепресією є дані, продемонстровані у зарубіжній роботі щодо здатності олеїнової кислоти, яка присутня у складі екстракту у переважній кількості, зокрема, до стимуляції експресії рецептору до ІЛ-2 на лімфоцитах, що його роль у трансдукції сигналу до стимуляції адаптивної імунної відповіді є добре відомою [228]. Ймовірним є також опосередкований вплив інших регуляторних факторів, що присутні у складі екстракту, на антигенпрезентуючі клітин та В-лімфоцити безпосередньо.

Успіх формування адаптивної імунної відповіді залежить, як відомо, від стану функціональної активності усіх ланок імунної системи, як специфічних її компонентів, так і факторів та клітин вродженого імунітету оскільки потребує їх регульованої кооперативної взаємодії.

За застосування ЕЕТП 9 вдалося встановити підвищення показників функціонального стану нейтрофілів периферичної крові – клітинних факторів вродженого імунітету.

Так, введення досліджуваної субстанції прискорило відновлення до фізіологічних рівнів показників фагоцитарної активності нейтрофілів (фагоцитарний індекс та число), бактерицидного їх потенціалу (коефіцієнт стимуляції у НСТ-тесті) та метаболічної активності (активність ферментів лужної фосфатази та мієлопероксидази, й рівень катіонних білків), як порівняно із тваринами, яким на фоні імунодепресії не вводили субстанцію, так і у разі введення препарату порівняння.

Суміжна закордонна робота демонструє здатність *in vitro* водорозчинної фракції екстракту з ембріонів курей до підвищення фагоцитарної активності таких клітин вродженого імунітету, як макрофаги у 2,8 разів у порівнянні із цим показником у мишей із циклофосфамідною імунодепресією. Жиророзчинна фракція екстракту також демонструвала стимулюючий ефект на фагоцитарну активність макрофагів, але менш значну [18]. Преінкубіція перитонеальних макрофагів із водорозчинною фракцією екстракту стимулювала здатність цих клітин до утворення ефекторної молекули NO в 3,2 раза порівнянно зі здатністю макрофагів, що були отримані від мишей із імунодепресією.

Сумація отриманих в ході нашої роботи експериментальних даних доводить, що застосування екстракту з ембріональних тканин птахів 9-ти днів розвитку підвищує активність процесів реконституції кісткового мозку, селезінки та тимусу в умовах радіаційно-індукованої імунодепресії, прискорює відновлення числа основних формених елементів та відносного числа субпопуляцій лімфоцитів периферичної крові, здійснюючи імуномодуляторний вплив на гемопоетичні цитокіни, що продукуються клітинами кісткового мозку. Показано, що застосування ЕЕТП 9 за вказаних умов забезпечує відновлення функціональної активності лімфоцитів та клітинних факторів неспецифічної резистентності, справляє антиоксидантний ефект, що створює плацдарм для успішного

формування адаптивної імунної відповіді, що було показано у експерименті з імунізації протигрипозною вакциною. Реконститутивні та імуномодулювальні біологічні ефекти, що здійснюється ЕЕТП 9 в умовах індукованої імунодепресії ми відносимо на рахунок його здатності справляти антиоксидантний ефект та на рахунок присутності у його складі фактору росту фібробластів, що був нами виявлений, що є важливим регулятором проліферації та диференціювання гемопоетичних стовбурових клітин та більш зрілих гемопоетичних попередників.

Результати дослідження дають обґрунтування подальших доклінічних та клінічних випробувань застосування екстракту з ембріональних тканин птахів 9-ти діб розвитку за індукованих гемо- та імунодепресій, що спостерігаються за широкої низки захворювань організму.

ВИСНОВКИ

У дисертаційній роботі наведено теоретичне узагальнення та представлено вирішення одного з сучасних наукових питань імунології – пошуку нових засобів корекції вторинної імунної недостатності. Встановлено здатність екстракту з ембріональних тканин птахів 9-ти діб розвитку відновлювати гемо-, імунопоез та імуногенез у тварин з радіаційною імунодепресією. Результати дисертаційного дослідження експериментально обґрунтовують доцільність розробки профілактичних та лікувальних засобів відновлення недостатності гемопоезу та імунної реактивності на основі екстракту з курячих ембріонів 9-ти діб розвитку.

1. ЕЕТП 9 містить $0,77 \pm 0,05$ мг/мл білка та $120 \pm 6,8$ нг/мл FGFb. Зберігання ЕЕТП 9 у рідкому азоті не впливає статистично достовірно на зазначені показники.

2. Цільний ЕЕТП 9 справляє більш виразний стимулювальний вплив *in vitro*, ніж окремі гідрофільна або гідрофобна фракції: посилює у 2,3 раза синтез ІЛ-2 спленоцитами, в 1,7 раза – фагоцитарний індекс перитонеальних макрофагів тварин з імуносупресією *in vitro*.

3. Одноразове застосування ЕЕТП 9 мишам в дозі 0,1 мг/кг за добу перед дією γ -випромінювання зрушує $LD_{50/30}$ з 6 Гр до 7 Гр. Фактор зміни дози для ЕЕТП 9 за одноразового застосування складає 1,16. Застосування ЕЕТП 9 забезпечує 38,1 % виживаність мишей протягом 30-ти діб після дії γ -випромінювання в дозі LD_{80-100} (9 Гр) порівняно з групою контролю, де спостерігалася 100 % летальність.

4. Відновлення морфологічного складу кісткового мозку, тимусу, селезінки за імунодепресії під впливом ЕЕТП 9 характеризується активацією процесів морфогенезу тканин органів, проліферації та диференціювання їх клітинних елементів у порівнянні зі спонтанною реконституцією. Структура кістковомозкової тканини набуває фізіологічного стану на 14 добу дослідження.

5. Повне відновлення абсолютного числа клітин кісткового мозку та популяційного складу його лімфоїдного компартменту у тварин з імунодепресією під дією ЕЕТП 9 відбувається на 14 добу, тимоцитів та каріоцитів селезінки – на 21 добу, що випереджає реконституцію зазначених показників ($p \leq 0,05$) під впливом препарату порівняння «Ербісол». Рівень продуктів ПОЛ в клітинах кісткового мозку за впливу ЕЕТП 9 досягає фізіологічних значень на 14 добу, поряд з його перевищенням на 30 % на цей термін у групі, що отримувала «Ербісол».

6. У тварин з імунодепресією, що отримували ЕЕТП 9, відновлення абсолютного числа лейкоцитів, лімфоцитів та гранулоцитів периферичної крові відбувається 14 добу, що випереджає реконституцію ($p < 0,05$) аналогічних показників у групі порівняння на 27 %, 57 % та 26 % відповідно. Нормалізація відносного числа Т-лімфоцитів та їх субпопуляцій у групах із застосуванням ЕЕТП 9 та «Ербісол» відбувається одночасно (на 7 добу), частки В-лімфоцитів – на 14 добу.

7. Мітоген-активована проліферативна активність Т-лімфоцитів у тварин з імунодепресією, що отримували ЕЕТП 9, відновлюється на 21 добу і перевершує аналогічний показник у тварин, що отримували препарат «Ербісол», у 1,5 рази. Фагоцитарний індекс та фагоцитарне число нейтрофілів досягають фізіологічного рівня у тварин із імунодепресією за впливу ЕЕТП 9 та «Ербісол» на 14 добу та 21 добу відповідно, у той час як аналогічні показники у контрольних тварин з імунодепресією були в 1,6 та 1,2 раза нижчими за норму. Поствакцинальні титри антитіл, продукованих В-лімфоцитами у тварин з імунодепресією, що отримували ЕЕТП 9, на 14 та 30 добу після імунізації перевищували аналогічні показники у тварин, яким застосовували «Ербісол», в 1,8 та 1,3 раза відповідно.

8. ЕЕТП 9 модулює продукцію гемопоетичних цитокінів протягом 1 доби після індукції імунодепресії: концентрація G-CSF зростає у 257 – 506 разів, IL-6 – у 1,5 – 25 разів, Flt3-ligand знижується в 1,1 – 1,6 раза порівняно з контролем, переважаючи ефекти від застосування «Ербісол». Нормалізація рівня IL-6 та Flt3-

ligand за впливу ЕЕТП 9 настає на 3 добу, G-CSF – на 7 добу, випереджаючи реконституцію фізіологічних рівнів означених цитокінів за використання препарату «Ербісол».

9. Застосування ЕЕТП 9 супроводжується збільшенням сироваткових рівнів ІЛ-1 β , ІЛ-6 та ІЛ-4 у мишей впродовж 1 доби після індукції радіаційної імунодепресії, достовірно підвищуючи їх рівні порівняно з контролем у 127,0 – 341,0, 2,0 – 350,0 та 3,0 – 60,0 разів відповідно, що значно перевищує ефекти препарату «Ербісол». Під впливом ЕЕТП 9 нормалізація рівнів ІЛ-1 β , ІЛ-6 та ІЛ-4 зареєстрована на 7 добу дослідження, тоді як за застосування препарату «Ербісол» нормалізація синтезу всіх означених цитокінів не спостерігається до закінчення періоду дослідження.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Mwambete KD, Tunzo J, Justin-Temu M. Prevalence and management of helminthiasis among underfives living with HIV/AIDS at Amana Hospital, Tanzania. *J Int Assoc Provid AIDS Care*. 2013 Mar-Apr;12(2):122-7.
2. Kim YC, Barshishat-Kupper M, McCart EA, Mueller GP, Day RM. Bone Marrow Protein Oxidation in Response to Ionizing Radiation in C57BL/6J Mice. *Proteomes*. 2014 Jun 25;2(3):291-302.
3. Bonagura VR. Dose and outcomes in primary immunodeficiency disorders. *Clin Exp Immunol*. 2014 Dec;178(1):7-9.
4. Bright PD, Rooney N, Virgo PF, Lock RJ, Johnston SL, Unsworth DJ. Laboratory clues to immunodeficiency; missed chances for early diagnosis? *J Clin Pathol*. 2015 Jan;68(1):1-5.
5. Maxfield L, Crane JS. Zinc, Deficiency. *StatPearls* [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2018 Jan. 2018 Mar 20.
6. Ress S. Investigation of adult immunodeficiency and indications for immunoglobulin replacement therapy. *S Afr Med J*. 2014 Sep 30;104(11):791-792.
7. Duraisingham SS, Buckland M, Dempster J, Lorenzo L, Grigoriadou S, Longhurst HJ. Primary vs. secondary antibody deficiency: clinical features and infection outcomes of immunoglobulin replacement. *PLoS One*. 2014 Jun 27;9(6):e100324.
8. Pawelec G. Immune correlates of clinical outcome in melanoma. *Immunology*. 2018 Apr;153(4):415-22.
9. Rossi AP, Budui S, Zoico E, Caliarì C, Mazzali G, Fantin F, D'Urbano M, Paganelli R, Zamboni M. Role of Anti-Inflammatory Cytokines on Muscle Mass and Performance Changes in Elderly Men and Women *J Frailty Aging*. 2017;6(2):65-71.
10. Guaraldi G, Zona S, Menozzi M, Brothers TD, Carli F, Stentarelli C, Dolci G, Santoro A, Da Silva AR, Rossi E, Falutz J, Mussini C. Late presentation increases risk

and costs of non-infectious comorbidities in people with HIV: an Italian cost impact study. *AIDS Res Ther.* 2017 Feb 16;14(1):8.

11. Brown G, Tsapogas P, Ceredig R. The changing face of haematopoiesis: A spectrum of options is available to stem cells. *Immunol Cell Biol.* 2018 Apr 10. doi: 10.1111/imcb.12055. [Epub ahead of print] Review. PMID: 29637611.

12. Bulati M, Caruso C, Colonna-Romano G. From lymphopoiesis to plasma cells differentiation, the age-related modifications of B cell compartment are influenced by "inflamm-ageing". *Ageing Res Rev.* 2017 Jul;36:125-136.

13. Vishnu P, Aboulafia DM. Haematological manifestations of human immune deficiency virus infection. *Br J Haematol.* 2015 Dec;171(5):695-709.

14. Reger MA, Schroeder T. Hematopoiesis. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2012 Dec; 4(12): a008250.

15. Drago-Serrano ME, Campos-Rodriguez R, Carrero JC, de la Garza M. Lactoferrin and Peptide-derivatives: Antimicrobial Agents with Potential Use in Nonspecific Immunity Modulation. *Curr Pharm Des.* 2018 Mar 27.

16. Esposito S, Mele R, Ingenito R, Bianchi E, Bonelli F, Monteagudo E, Orsatti L. An efficient liquid chromatography-high resolution mass spectrometry approach for the optimization of the metabolic stability of therapeutic peptides. *Anal Bioanal Chem.* 2017 Apr;409(10):2685-96.

17. Isakov VA, Isakov DV. Immunomodulators in the treatment and prevention of herpes virus infections. *Klin Med.* 2015;93(4):16-24.

18. Li X, Yu Su, Sun J, Yang Ya. Chicken embryo extracts enhance spleen lymphocyte and peritoneal macrophages function. *Journal of Ethnopharmacology.* 2012;144:255-60.

19. Morales-Garcia MR, Lopez-Mendez J, Pless R, Garcia-Morales E, et al. Brucellosis outbreak in a rural endemic region of Mexico - a comprehensive investigation. *Vet Ital.* 2015 Jul-Sep;51(3):185-90.

20. Дыгай АМ, Жданов ВВ. Теория регуляции кроветворения в норме и при патологии. *Бюллетень СО РАМН.* 2012;32(1):21-30.

21. Ржепаковский ИВ, Тимченко ЛД, Вакулин ВН, Ржепаковский ВВ. Экспериментальное обоснование приготовления препарата «СТЭМБ». Вестник МГОУ. Серия: Естественные науки. 2010;1:56-60.
22. Bein J, Chen H, Sadovoy J, Weissman AD. Fertilized egg and use thereof Pat. № WO2009086634 A1. United Paragon Associates Inc., Canada. Date of publ. 16 July 2009.
23. Suraeva NM, Morozova LF, Ryabaya OO, Khochenkova YA, SamoiloV AV, Burova OS, Golubtsova NV, Barmashov AE, Baryshnikova MA. Characteristics of Mel Ibr Melanoma Line Subclone after Treatment with Chicken Embryo Extract. Bull Exp Biol Med. 2017 Jun;163(2):255-9.
24. Chehelcheraghi F, Eimani H, Sadraie SH, Torkaman G, Amini A, Shemshadi H, Majd HA. Improved viability of random pattern skin flaps with the use of bone marrow mesenchymal-derived stem cells and chicken embryo extract. Iran J Basic Med Sci. 2015 Aug;18(8):764-72.
25. Чоп'як ВВ, Потьомкіна ГО, Гаврилюк АМ. Клінічна імунологія: цикл лекцій, частина 1. Львів; 2010. 226 с.
26. Новиков ДК, Новиков ПД. Клиническая иммунопатология. Москва, 2009. 464 с.
27. Никулин БА. Оценка и коррекция иммунного статуса. Москва:Геотар-Медиа, 2007. 376 с.
28. Чепель Э, Хайне М, Мисбах С, Сновден Н. Основы клинической иммунологии: реферат для медицинских вузов, пер. с англ. 5-е изд. Москва: ГЭОТАР-Медиа, 2008. 416 с.
29. Симонова АВ, Лебедева ИС. Инновационные методы диагностики и лечения вторичных иммунодефицитных состояний [Интернет]. Лечащий врач. 2012;4. Режим доступа: [www. ivrach.ru](http://www.ivrach.ru).
30. Аклеев АВ. Основные заключения по радиобиологическим эффектам для целей радиационной защиты. Радиационная биология. Радиоэкология. 2011;51(5):501-11.

31. Иванов ВЛ, Жаворонков ЛП. Оценка возможности модификации лучевого поражения крыс при помощи цитотоксической сыворотки. Радиация и риск. 2012;21(1):58-65.
32. Присяжнюк АЕ, Базыка ДА, Романенко АЕ, и др. Риск рака в группах населения, пострадавшего вследствие аварии на Чернобыльской АЭС. Довкілля та здоров'я. 2013;3:34-41.
33. Білько НМ. Розробка способу експансії та оцінки стовбурових клітин-попередників гемопоєзу у довготривалих культурах *in vitro* і *in vivo*: звіт про НДР. Національний університет «Києво-Могилянська академія». Київ; 2011. 60 с.
34. Lim WF, Inoue-Yokoo T, Tan KS, et al. Hematopoietic cell differentiation from embryonic and induced pluripotent stem cells. Stem Cell Research & Therapy. 2013;4(3):71.
35. Flores-Guzmán P, Fernández-Sánchez V, Mayani H. Concise review: *ex vivo* expansion of cord blood-derived hematopoietic stem and progenitor cells: basic principles, experimental approaches, and impact in regenerative medicine. Stem Cells Translational Medicine. 2013;2(11):830-8.
36. Yoon K-A, Cho H-S, Shin H-I, Cho J-Y. Differential regulation of *cxcl5* by *fgf2* in osteoblastic and endothelial niche cells supports hematopoietic stem cell migration. Stem Cells and Development. 2012;21(18):3391-402.
37. Kovtonyuk LV, Fritsch K, Feng X, et al. Inflammaging of hematopoiesis, hematopoietic stem cells, and the bone marrow microenvironment. Frontiers in Immunology. 2016;7:502.
38. Jagannathan-Bogdan M, Zon LI. Hematopoiesis. Development (Cambridge, England). 2013;(12):2463-7.
39. Wetzig A., Alaiya A., Al-Alwan M, et al. Differential marker expression by cultures rich in mesenchymal stem cells. BMC Cell Biology. 2013;14:4.
40. Zhao E, Xu H, Wang L, et al. Bone marrow and the control of immunity. Cellular and Molecular Immunology. 2012;9(1):11-9.

41. Чайлахян РК. Сравнительное исследование эффективности трансплантации мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток костного мозга, культивированных в условиях нормоксии и гипоксии, и их кондиционированных сред на модели острого повреждения легких. Клеточные технологии в биологии и медицине. 2014;1:25-30.
42. Muench MO, Beyer AI, Fomin ME, et al. The adult livers of immunodeficient mice support human hematopoiesis: evidence for a hepatic mast cell population that develops early in human ontogeny [Internet]. PLoS ONE. 2014;9(5):e97312.
43. Щегельская ЕА, Микулинский ЮЕ, Кульшин ВЕ, и др. Дифференцировка *in vitro* клеток стромы костного мозга мыши в клетки-предшественники нейронов и гепатоцитов. Экспериментальна і клінічна медицина. 2002;1:16-20.
44. Ogawa Y, Yonekura S, Nagaо T. Granulocyte colony – stimulating factor production by human bone marrow fibroblasts stimulated with interleukins. Amer. J. Hematol. 1996;52(2):71-6.
45. Lin Y, Yoder MC, Yoshimoto M. Lymphoid Progenitor Emergence in the Murine Embryo and Yolk Sac Precedes Stem Cell Detection. Stem Cells and Development. 2014;23(11):1168-77.
46. Taichman RS, Reilly MJ, Verma RS, Emerson SG. Augmented production of interleukin-6 by normal human osteoblasts in response to CD34+ hematopoietic bone marrow cells *in vitro*. Blood. 1997;89(4):1165-72.
47. Mercier FE, Ragu C, Scadden DT. The bone marrow at the crossroads of blood and immunity. Nature reviews Immunology. 2011;12(1):49-60.
48. Isern J, García-García A, Martín AM, et al. The neural crest is a source of mesenchymal stem cells with specialized hematopoietic stem cell niche function [Internet]. eLife. 2014;3:e03696.
49. Krause DS, Scadden DT, Preffer FI. The hematopoietic stem cell niche — home for friend and foe? Cytometry Part B, Clinical cytometry. 2013;84(1):10.

50. Gibson FM, Scopes J, Daly S, et al. Haemopoietic growth factor production by normal and aplastic anaemia stroma in long-term bone marrow culture. *Br. J. Haematol.* 1995;91:551-61.
51. Denu RA, Nemcek S, Bloom DD, et al. Fibroblasts and mesenchymal stromal/stem cells are phenotypically indistinguishable. *Acta haematologica.* 2016;136(2):85-97.
52. Sun H-P, Zhang X, Chen X-H, et al. Human umbilical cord blood-derived stromal cells are superior to human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells in inducing myeloid lineage differentiation in vitro. *Stem Cells and Development.* 2012;21(9):1429-40.
53. Ornitz DM, Itoh N. The fibroblast growth factor signaling pathway. *Wiley Interdisciplinary Reviews Developmental Biology.* 2015;4(3):215-66.
54. Itoh N. The fgf families in humans, mice and zebrafish: their evolutionary processes and roles in development, metabolism, and disease. *Biol. Pharm. Bull.* 2007;30(10):1819-25.
55. Goetz R, Mohammadi M. Exploring mechanisms of FGF signalling through the lens of structural biology. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2013;14(3):166-80.
56. Schuliga M, Javeed A, Harris T, et al. Transforming growth factor- β -induced differentiation of airway smooth muscle cells is inhibited by fibroblast growth factor-2. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2013;48(3):346-53.
57. D'Mello S, Elangovan S, Salem AK. FGF2 gene activated matrices promote proliferation of bone marrow stromal cells. *Arch Oral Biol.* 2015;60(12):1742-9.
58. Linet MS, Schubauer-Berigan MK, Weisenburger DD, et al. Chronic lymphocytic leukaemia: an overview of etiology in light of recent developments in classification and pathogenesis. *Br. J. Haematol.* 2007;139:86-94.
59. Alava A, Hood JD, Fausto R, et al. Role of Raf in vascular protection from distinct apoptotic stimuli. *Cheresh Science.* 2003;301(5629):94-6.

60. Di Bernardo MC, Crowther-Swanepoel D, Broderick P, et al. A genome-wide association study identifies six susceptibility loci for chronic lymphocytic leukemia. *Nat. Genet.* 2008;40:1204-15.
61. De Haan G, Weersiong E, Dontje B, et al. In vitro generation of long-term repopulating hematopoietic stem cells by Fibroblast Growth Factor-1. *Developmental Cell.* 2003;4(2):241-51.
62. Zhao M, Ross GT, Itkin T, et al. FGF signaling facilitates postinjury recovery of mouse hematopoietic system. *Blood.* 2012;120(9):1831-42.
63. Eckert S, Bauer G. TGF-beta isoforms and fibroblasts growth factor exhibit analogous indirect antioncogenic activity through triggering of intracellular induction of apoptosis. *Anticancer Res.* 1998;18(1A):45-52.
64. Ревякина ВА. Педиатрические рекомендации по иммуномодулирующим препаратам в амбулаторной практике. *Лечащий врач.* 2015;4:25-30.
65. Хаитов РМ, Пинегин БВ. Иммуномодуляторы: классификация, фармакологическое действие, клиническое применение [Интернет]. 2004;7. Режим доступа:<http://www.pharmateca.ru/ru/archive/article/5343>.
66. Гармаева ГН. Лечение желудочно-кишечных болезней телят и ягнят природными лекарственными средствами [Автореф. дис. канд.вет.наук.]. Улан-Удэ: Бурятская гос. с.-х. акад. 1999. 29с.
67. Рубцов БВ, Ружицкий АО. Действие некоторых тритерпеновых гликозидов морских беспозвоночных на проницаемость мембран. Владивосток: Дальнаука, 1997. 28 с.
68. Седов АМ, Аполлони АВ, Севастьянова ЕК. Стимуляция тритерпеновыми гликозидами неспецифической антибактериальной резистентности мышей к условно-патогенной грамотрицательным микроорганизмам. *Антибиот. и химиотер.* 1990;35(1):23-6.
69. Kisa F, Yamada K, Miyamoto T, Inagaki M, Higuchi R. Constituents of Holothuroidea, 18. Isolation and structure of biologically active disialo- and trisialo-

gangliosides from the sea cucumber *Cucumaria echinata*. *Chem Pharm Bull (Tokyo)*. 2006 Sep;54(9):1293-8.

70. Алешина РМ. Иммуноterapia простудных заболеваний дыхательных путей как профилактика обострений бронхиальной астмы. *Клиническая иммунология. Аллергология. Инфектология*. 2010;(3):53-7.

71. Ушакова НА, Некрасов РВ, Правдин ВГ, и др. Новое поколение пробиотических препаратов кормового назначения. *Фундаментальные исследования*. 2012;1:184-92.

72. Жихорева НС. Опыт применения комплексных пробиотических препаратов [Интернет]. *Российский медицинский журнал «Мать и дитя (педиатрия)»*. 2007;21. Режим доступа : www.rjm.ru/numbers_381.html.

73. Johnston BC, Goldenberg JZ, Vandvik PO, et al. Probiotics for the prevention of pediatric antibiotic-associated diarrhea. *The Cochrane Collaboration*. Published by John Wiley & Sons, Ltd. Published Online: 9 Nov 2011 Assessed as up-to-date: 24 May 2010.

74. Семидоцкая ЖД, Чернякова ИА, Бездетко ТВ и др. Опыт применения нуклеината в лечении часто и длительно болеющих пациентов [Интернет]. *Новости медицины и фармации*. 2007;16(222). Режим доступа: <http://www.mif-ua.com/archive/article/3146>.

75. Павлова ИН. Применение нуклеината натрия в комплексном лечении больных раком молочной железы IV-IIIa стадии [Автореф. дис.канд.мед.наук:14.01.12.]. Ростов-на-Дону: Астраханская государственная медицинская академия. 2011. 121с.

76. Жамкова МЮ. Применение нуклеината натрия в комплексном лечении больных раком молочной железы IIIa стадии. *Бюллетень медицинских интернет-конференций:Тез. докл.* 2013;3(3):801.

77. Пудилова ЭВ, Бродовский МБ, Лебединская ЕА. Влияние нуклеината натрия на функциональные и иммунофенотипические особенности мононуклеарных лейкоцитов периферической крови здоровых доноров

[Интернет]. Материалы II Общероссийской студенческой электронной научной конференции «Студенческий научный форум». 2010. Режим доступа:<http://rae.ru/forum2010/52/791>.

78. Neta R, Oppenheim JJ, Douches SD. Interdependence of the radioprotective effects of human recombinant interleukin 1 alpha, tumor necrosis factor alpha, granulocyte colony-stimulating factor, and murine recombinant granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *J. Immunol.* 1988; 140(1):108-11.

79. Бурлакова ЕБ, Аткарская МВ, Фаткуллина ЛД, Андреев СГ. Радиационно-индуцированные изменения структурного состояния мембран клеток крови человека. *Радиационная биология. Радиоэкология.* 2014;2:162-8.

80. Bensinger W, Di Persio GF, McCarty JM. Improving stem cell mobilization strategies: future directions. 2009;43:181-95.

81. Capoccia BJ, Shepherd RM, Link DC. G-CSF and AMD3100 mobilize monocytes into the blood that stimulate angiogenesis *in vivo* through a paracrine mechanism. *Blood.* 2006;108:2438-45.

82. Dugan MJ, Maziars RT, Bensinger WI, et al. Safety and preliminary efficacy of prelixator (Mozobil&trade) in combination with chemotherapy and G-CSF: an open-label, multicenter, exploratory trial in patients with multiple myeloma and non-Hodgkin's lymphoma undergoing stem cell mobilization. *Bone Marrow Transplant.* 2010;43:39-47.

83. Arvedson T, Molineux G, Foote M, Arvedson T. Use of r-metHuG-CSF to enable chemotherapy delivery for solid tumors, in twenty years of G-CSF. *Clinical and nonclinical discoveries.* Springer; 2012:151-68.

84. Levesque JP, Winkler IG. Mobilization of hematopoietic stem cells: state of the art. *Current opinion in organ transplantation.* 2008;13:53-8.

85. Gasparetto C, Gasparetto M, Morze M, et al. Mobilization of dendritic cells from patients with breast cancer into peripheral blood stem cell leukapheresis samples using Flt-3-ligand and G-CSF or GM-CSF. *Cytokine.* 2002;18(1):8-19.

86. Нуриев РИ. Проблемы и перспективы современной иммунотерапии. Российский биотерапевтический журнал. 2016;15(1):78-9.
87. Нестерова ИВ, Ломтатидзе ЛВ, Кокова ЛН, Ковалева СВ. Интерферон альфа-2 в комплексной иммунотерапии хронического упорно-рецидивирующего орофациального герпеса [Интернет]. Лечащий врач. 2011;(4). Режим доступа: <http://www.lvrach.ru/2011/04>.
88. Молочков АВ. Место иммунотерапии в комплексном лечении хронической урогенитальной хламидийной инфекции. Эффективная фармакотерапия в акушерстве и гинекологии. 2007;2:12-15.
89. Gunderson LL, Tepper JE. Clinical radiation oncology (Fourth edition). Elsevir Helth Sciences;2015. 1638 p.
90. Bore ET, Kellerman RD. Conn's Current Therapy 2016. Elsevir Helth Sciences;2016. 1344 p.
91. Schrader JW. Lymphokines. Interleukin-3: The panspecific hemopoetin. Academic Press;1999. 444 p.
92. Арутюнян ИВ, Кананыхина ЕЮ, Фатхудинов ТХ, и др. Ангиогенный потенциал мультипотентных стромальных клеток пупочного канатика: исследование *in vitro* [Интернет]. Клеточные технологии в биологии и медицине. 2016;1. Режим доступа: <http://www.iramn.ru/journal/ktbm/2016/ktbm1601.htm>.
93. Paludan-Müller C, Valyasevi R, Huss HH, et al. Genotypic and phenotypic characterization of garlic-fermenting lactic acid bacteria isolated from som-fak, a Thai low-salt fermented fish product. Journal of Applied Microbiology. 2002;92(2):307-14.
94. Рубинский ИА, Петрова ОГ. Иммунные стимуляторы в ветеринарии. Екатеринбург;2012. 720 с.
95. Гизатуллин РР. Гигиеническое обоснование коррекции естественной резистентности организма телят биологическим стимулятором "Биостим" [Автореф. дис. канд.вет.наук:16.00.06.]. Уфа: Башкирский гос. ун-т. 2001. 23с.
96. Багданова ОС. Ветеринарно-гигиеническая оценка применения препарата "Биостим" для стимуляции воспроизводительной функции коров

[Автореф. дис. канд.вет.наук:16.00.06].Уфа: Башкирский государственный аграрный университет. 2003. 23с.

97. Ломакіна ОВ, Риндіна НГ, Шушляпін ОІ, Ольховський ДВ. Основні принципи призначення імуноотропної терапії. Імунопрофілактика. Імунореабілітація [Интернет]. Новости медицины и фармации. Антимикробная терапия и пульмонология. 2012;408. Режим доступа: <http://www.mif-ua.com/archive/article/28960>.

98. Fundenberg НН, Pizza G. Transfer Factor1993 New frontiers In Progress in Drug resourch. Boston: Birkhauser Verlag Basel. 1994;42:309-400.

99. Хаитов РМ, Пинегин БВ. Современные иммуномодуляторы. Классификация. Применение. Москва:ФАРМАРУС ПРИНТ, 2005. 27 с.

100. Строев ЮВ, Блинков ЮЮ, Конопля АИ, Гаврилук ВП. Фармакологическая коррекция иммунных и оксидантных нарушений при распространенном перитоните. Фундаментальные исследования. 2011;2:152-6.

101. Дергунов АА. Влияние биогенных препаратов на обмен веществ, клинико-биохимическое состояние и продуктивность животных [Дис. канд. биол.наук:03.00.04.].Ставрополь: Всероский науч.-исслед. ин-т животноводства. 2009. 143 с.

102. Пальчиков АЮ. Регуляция адаптационно-компенсаторных реакций у коров при недостаточности фетоплацентарного комплекса бионормализатором из плаценты [Дис. канд.биол.наук.].Белгород: Белгородская государственная сельскохозяйственная академия. 2004. 148с.

103. Востроилова ГА. Экспериментальная и клиническая фармакология препаратов плаценты, полученных методом криофракционирования [Дис. докт.биол.наук.].Воронеж: Росийская академия сельскохозяйственных наук. 2007. 350с.

104. Кадыков АС, Шапаронова НВ. Ранняя реабилитация больных, перенесших инсульт. Роль медикаментозной терапии. Нервные болезни. 2014;(1):22-5.

105. Сычева ИВ, Пасов ВВ. Лучевые повреждения органов малого таза после лечения ранних стадий рака предстательной железы. Радиация и риск. 2014;23(4):99-115.
106. Строков ИА. Актовегин: механизмы действия и эффективность при неврологических осложнениях диабета. Нервные болезни. 2012;19(13):22-6.
107. Коротковский ГС, Зудин АН, Учкин ИГ, и др. Медикаментозное лечение хронической ишемии нижних конечностей [Интернет]. Русский медицинский журнал. 2010;17(13):1046. Режим доступа: <http://www.rmj.ru/articles/khirurgiya/>.
108. Фещенко ЮИ, Рекалова ЕМ. Особенности современной иммуномодулирующей терапии. Астма та алергія. 2013;1:6-12.
109. Николаенко АН, Черемшенко НЛ, Диденко ГВ, и др. Противоопухолевая активность препаратов класса «Эрбисол®» *in vitro* и *in vivo*. Онкологія. 2011;13(4):289-93.
110. Зампольская ЕБ. Иммуноterapia в онкологии. Международный эндокринологический журнал. 2013;6:161.
111. Щегловитова ОН. Первичная культура клеток сосудистого эндотелия человека проявляет интерферонпродуцирующую, антивирусную и иммуномодулирующую активность под воздействием иммуномодуляторов. Иммунология. 2012;3:116-9.
112. Гарюк ГІ. Місцеве використання імуномодулятора ербісол у комплексному лікуванні хронічного ларингіту у хворих із персистенцією герпесвірусної інфекції (вірус простого герпесу людини). Проблеми безперервної медичної освіти та науки. 2012;(4):55-9.
113. Дземан МІ. Оптимізація схеми застосування імуномодулятору Ербісол® Ультрафарм у комплексному лікуванні пацієнтів із хронічною персистуючою вірусною інфекцією. Сучасні інфекції. 2010;2:128-34.
114. Терьошин ВО. Вплив Ербісолу та Циклоферону на стан системи інтерферону у хворих з гострим тонзилітом вірусно-бактерійної етіології. Інфекційні хвороби. 2005;3:33-5.

115. Тимченко ЛД, Косик НВ. Новый стимулятор роста микроорганизмов. Матеріалі научної конференції «Університетська наука регіону». Ставрополь.2004. 220 с.

116. Черников СВ. Динамика альфа-фетопротеина, минеральных элементов и показателей физического развития у куриных эмбрионов в онтогенезе. [Автореф. дис. канд.биол.наук:03.03.05.].Ставрополь:Ставропольский государственный университет. 2012. 23 с.

117. Сизов АА. Исследование свойств экстрактов и компонентов эмбриональных тканей птиц раннего срока развития и получение на их основе ветеринарного препарата иммуностимулирующего действия. [Автореф. дис. канд.биол.наук:16.00.03.].Новосибирск: Институт ветеринарной медицины Омского агроуниверситета. 1996. 20 с.

118. Яшин ИВ. Физиологическое обоснование применения иммуностимулирующего тканевого препарата для коррекции воспроизводительной функции коров [Дис. канд.биол.наук:03.03.01.].Нижний Новгород: Нижегородская гос. с.-х. академия. 2010. 139с.

119. Bein J. Process for preparing fertilized egg components. Patent № US20100163792 A1. United Paragon Associates Inc., Canada. 2010 July 1. 100p.

120. Зайцева ЕВ. Морфология иммунной системы птиц. Брянск:Ладомир, 2011. 109 с.

121. Старун АС. Костномозговое кроветворение и иммунореактивность цыплят в норме и при вакцинации против инфекционного ларинготрахеита на фоне применения витамина С [Автореф. дис. канд.биол. наук:03.00.13]. Омск: Омский государственный аграрный университет. 2005. 36 с.

122. Болотников ИА, Соловьев ЮВ. Гематология птиц. Москва:Наука, 1980.115 с.

123. Strehlow D, Gilbert W. A fate map for the first cleavages of the zebrafish. Nature. 1993;361:451-3.

124. Главный комплекс гистосовместимости домашних животных птиц. Режим доступа:<http://worldgonesour.ru/veterinarnaya-immunologiya/2434-glavnyu-kompleks-gistosovmestimosti-domashnih-zhivotnyh-ptic.html>.
125. Шашанов ИР, Тельцов ЛП, Николаев АД. Эмбриогенез. Периодизация развития кур. Известия оренбургского государственного аграрного университета. Биологические науки. 2008;20-1(4):64-71.
126. Тимус, или зобные железы у птичьего эмбриона. Режим доступа: <http://www.activestudy.info/timus-ili-zobnye-zhelezy-u-ptichego-embriona/>.
127. Karabagli H. Survey of fibroblast growth factor expression during chick organogenesis. *The anatomical record*. 2002;268:1-6.
128. Alvarez IS, Araujo M, Nieto MA. Neural induction in whole chick embryo cultures by FGF. *Devl Biol*. 1998;199(1):42-54.
129. Sugahara F, Aota S, Kuraku S, Murakami Y, Takio-Ogawa Y, Hirano S, et al. Involvement of Hedgehog and FGF signaling in the lamprey telencephalon: evolution of regionalization and dorsoventral patterning of the vertebrate forebrain. *Development*. 2011;138(6):1217-26.
130. Dorey K, Amaya E. FGF signaling: diverse roles during early vertebrate embryogenesis. *Development*. 2010;137(22):3731-42.
131. Sun H, Ye T, Wang Y, Wang L, Chen Y, Li B. Antioxidant activities of chick embryo egg hydrolysates. *Food Science Nutrition*. 2014;2(1):58-64.
132. Sparks NHC. The hen's egg – is its role in human nutrition changing? *World Poult Sci J*. 2006;62:308-15.
133. Wu Q, Yao HD, Zhang ZW, Zhang B, Meng FY, Wang XL. Possible correlation between selenoprotein W and myogenic regulatory factors in chicken embryonic myoblasts. *Biol Trace Elem Res*. 2012 Dec;150(1-3):166-72.
134. Chen C, Chi YJ, Zhao MY, Lv L. Purification and identification of antioxidant peptides from egg white protein hydrolysate. *Amino Acids*. 2012 Jul;43(1):457-66.

135. Solberg E. The effects of powdered fertilizer eggs on depression. *J Med Food*. 2011 Jul-Aug;14(7-8):870-5.
136. Трунова АП. Особенности развития и иммуногенез куриного эмбриона под влиянием амброзийного антигена [Дис. канд.биол. наук:3.00.30.]. Ставрополь: Ставропольский государственный университет. 2008. 181 с.
137. Потебня ГП, Діденко ГВ, Кузьменко ОП, Шпак ЄГ, Лісовенко ГС, Черемшенко НЛ, и др, винахідники; «Інститут експериментальної патології, онкології і радіобіології ім. Р.Є. Кавецького НАН України». Спосіб одержання протипухлинної вакцини. Патент України на корисну модель. № UA 77647 U. 2013 лютий 25.
138. Болюх ІА, Діденко ГВ, Шпак ЄГ, Кузьменко ОП, Лісовенко ГС, Потебня ГП. Роль БТШ-пептидних комплексів у конструювання протипухлинних вакцин. Доповіді національної академії наук. 2014;2:146-52.
139. European convention for the protection of vertebrate animals used for experimental and other scientific purposes. Strasbourg. Council Treaty Series; 1987;123. 52 p.
140. Жегунов ГФ, Кузнецова ВГ, Тимохіна ЮО, Мершинець ЮО, Погоріла МС, винахідники; Харківська державна зооветеринарна академія, патентовласник. Отримання екстракту з ембріонів курей. Патент України на корисну модель. № u 201307028. 2013 листопад 25.
141. Доклинические исследования лекарственных средств (методические рекомендации). Стефанов АВ, редактор. Киев. Авиценна; 2002. 568 с.
142. Державна Фармакопея України. Державне підприємство “Науково-експертний фармакопейний центр”. 1-е вид. Доповнення 2. Державне підприємство «Науково-експертний фармакопейний центр»; 2008. 620 с.
143. Кусакина МГ, Суворов ВИ, Чудинова ЛА. Большой практикум «Биохимия». Лабораторные работы: Учеб. Пособие. Перм. гос. науч. исслед. ун-т. Пермь; 2012. 148 с.

144. Титова НМ, Субботина ТН. Энзимология: Лабораторный практикум, Красноярск. Сиб. федер. ун-т; 2012. 60 с.
145. Мінаєва ВО. Хроматографічний аналіз. Черкаський національний університет ім. Богдана Хмельницького; 2013. 284 с.
146. Ариповский АВ, Колесник МИ, Веждед МИ, Титов ВН. Метод подготовки проб для газовой хроматографической определения жирных кислот без предварительной экстракции липидов. Клиническая лабораторная диагностика. 2012;1:3-6.
147. Weigle WO, Cochrane G, Dixon FL. Anaphylactogenic properties of soluble antigen-antibody complexes in the guinea pig and rabbit. *J Immunol.* 1960; 85:469-77.
148. Okunieff P, Swarts S, Keng P, Sun W, Wang W, Kim J et al. Antioxidants reduce consequences of radiation exposure. *Adv Exp Med Biol.* 2008;614:165-78.
149. Зиматкин СМ, Мацюк ЯР, Можейко ЛА, Михальчук ЕЧ. Гистология, цитология и эмбриология : учебник. Минск; 2012. 462 с.
150. Новикова ИА, Ходулева СА. Методы клинической и лабораторной гематологии: учебное пособие. Минск; 2013. 446 с.
151. Davidson WF, Parish CR. A procedure for removing red cells and dead cells from lymphoid cell suspension. *J Immunol Meth.* 1975;7(2-3):291-300.
152. Адо АД, Алексеева ГА, Кравченко СА. О взаимодействии иммунных и медиаторных рецепторов лимфоцитов мышей. *Бюл. эксп. биол. и мед.* 1985;5:589-92.
153. Mage MG, McHugh LL, Rothstein NL. Mouse lymphocytes with and without surface immunoglobulin: preparative scale, separation in polystyrene tissue culture dishes coated with specifically purified anti-immunoglobulin. *Immunol Meth.* 1977;15(1):47-56.
154. Калинкович АБ, Пинегин БВ, Орлов ЭВ, и др. Распределение В-супрессоров во фракциях клеток селезенки иммунных мышей, различающихся по скорости седиментации. *Иммунология.* 1986;2:31-4.

155. Александров МТ, Кудрявицкий АИ, Румянцева ЕГ. и др. Метод вычисления абсолютных показателей фагоцитоза. *Лабораторное дело*. 1988;9:30-2.
156. Алексеев ВВ. Медицинские лабораторные технологии: руководство по клинической лабораторной диагностике в 2-х т.. Каприщенко АИ, редактор. Москва, ГЭОТАР-Медиа; 2013. 792 с.
157. Пигаревский ВЕ, Мазинг ЮА. Лизосомально-катионные белки. *Лабораторное дело*. 1981;10:579-582.
158. Фримель Г. Иммунологические методы. Москва, Медицина; 1987. 472 с.
159. US Centers for disease Control and Prevention. Interim guidance for infection control for care of patients with confirmed or suspected novel influenza A [Internet]. Access mode: http://www.cdc.gov/h1n1flu/guidelines_infections-control.htm.
160. Некрасов ЭВ. Методы анализа перекисного окисления липидов в медико-биологических исследованиях. *Бюллетень физиологии и патологии дыхания*. 2012;46:98-108.
161. Кочетов АГ, Лянг ОВ, Масенко ВП, Жиров ИВ, Наконечников СН, Терещенко СН. Методы статистической обработки медицинских данных: Методические рекомендации для ординаторов и аспирантов медицинских учебных заведений, научных работников. Москва, РКНПК; 2012. 42 с.
162. Горяинова ЕР, Панков АР, Платонов ЕН. Прикладные методы анализа статистических данных. Учебное пособие. Москва изд. дом Высшей школы экономики; 2012. 310 с.
163. Тимченко ЛД, Ржепаковский ИВ, Арешидзе ДА. Перспективы использования биологически активных препаратов на основе экстрактов эмбриональных тканей кур. *Вестник МГОУ. Серия «Естественные науки»*. 2009;2:94-7.
164. Погоріла МС, Романова ОА, Сидоренко ТА, Ігумнова НІ, Юхименко ВІ, Щербак ОМ. Вміст FGFβ в екстракті з ембріональних тканин птахів. Міжнародна науково-практична конференція «Проблеми та стан розвитку медичної науки та практики в Україні», 10-11 червня 2016, м. Дніпро. 2016;96-8.

165. Кузнецова ВГ, Погоріла МС, Жегунов ГФ. Дослідження вмісту амінокислот та жирних кислот в екстракті з ембріонів курей. «Вісник проблем біології та медицини». 2014;3(115):60-4.

166. Погоріла МС, Щербак ОМ. Вплив екстракту із ембріональних тканин птахів та його фракцій на рівень продукції ІЛ-2 *in vitro* за імунодепресії в експерименті. Науково-практична конференція молодих вчених, присвячена 25-річчю Національної академії медичних наук України. Журнал Національної академії медичних наук України. Матеріали конференції. Спеціальний випуск, Київ, 23 березня 2018:86.

167. Миронов АН, Бутанян НД, и др. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Часть первая. Москва: «Гриф и К», 2012. 944 с.

168. Погоріла МС, Романова ОА, Щербак ОМ. Оцінка алергізуючих властивостей препарату з ембріональних тканин птахів. Матеріали міжнародної науково-практичної конференції «Сучасні тенденції у медичних та фармацевтичних науках», 5-6 грудня 2014 р., Київ. 2014;119-20.

169. Погоріла МС, Романова ОА, Щербак ОМ, Сидоренко ТА. Оцінка радіозахисної ефективності застосування препарату з ембріональних тканин птахів за показниками виживаності. Матеріали науково-практичної конференції з міжнародною участю «Щорічні терапевтичні читання: Від досліджень до реалій клінічної практики XXI століття» присвяченій пам'яті академіка Л.Т. Малої 23-24 квітня 2015 року, м. Харків. 2015;234.

170. Nagasawa T, Sugiyama T. Bone marrow niches for hematopoietic stem cells and immune cells. *Inflamm Allerg Drug Targets*. 2012 Jun;11(3):201-6.

171. Wright LE, Buijs JT, Kim HS, Coats LE, Scheidler AM, John SK, et al. Single-limb irradiation induces local and systemic bone loss in a murine model. *J Bone Miner Res*. 2015 Jul;30(7):1268-79.

172. Chandra A, Lin T, Young T, Tong W, Ma X, Tseng WJ, et al. Suppression of sclerostin alleviates radiation-induced bone loss by protecting bone-forming cells and

their progenitors through distinct mechanisms. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American society for bone and mineral research*. 2017;32(2):360-72.

173. Погорелая МС. Влияние препарата из эмбриональных тканей птиц на морфологию бедренной кости мышей, подвергнутых действию тотального γ -излучения. *Научные ведомости Белгородского государственного университета. Естественные науки*. 2015;9(206):73-9.

174. Silva TA, Souza MA, Cecilio NT, Roque-Barreira MC. Activation of spleen cells by ArtinM may account for its immunomodulatory properties. *Cell Tissue Res*. 2014 Sep;357(3):719-30.

175. Погоріла МС. Вплив препарату з ембріональних тканин птахів на морфологію тимусу мишей за радіаційної імунодепресії. «Вісник проблем біології та медицини». 2015;1(118):98-102.

176. Погорелая МС, Жегунов ГФ, Щербак ОН. Влияние экстракта из куриных эмбрионов на количественные изменения в периферической крови мышей вследствие однократного тотального γ -облучения. *Вестник Харьковского национального университета имени В.Н. Каразина, серия "Биология"*. 2013;1079(18):164-71.

177. Mickelsen AB. *Medical consequences of radiological and nuclear weapons*. Government Printing Office, 2012:130-7.

178. Singh VK, Romaine PLP, Seed TM. Medical Counter measures for Radiation Exposure and Related Injuries: Characterization of Medicines, FDA-Approval Status and Inclusion into the Strategic National Stockpile. *Health Phys*. 2015;108(6):607-30.

179. *Molecular Biology of Hematopoiesis 5*. In Abraham NG, Asano S, Brittinger G, Maestroni GJM, Shaddock RK, edotors. Springer Science & Business Media; 2012:645-8.

180. Pohorila MS, Popov MM, Romanova OA, Sherbak OM, Martinov AV. Dynamics of hematopoiesis regulators content in bone marrow under the poultry embryonic tissue extract usage for the radiation-caused immune damage correction.

Вестник Харьковского национального университета имени В.Н. Каразина, Серия "Биология". 2016;27:131-40.

181. Casanova-Acebes M, Pitaval C, Weiss LA, Nombela-Arrieta C. Rhythmic modulation of the hematopoietic niche through neutrophil clearance. *Cell*. 2013;153(5):1025-35.

182. Nappo G, Handle F, Santer FR, McNeill RV, Seed RI, Collins AT, et al. The immunosuppressive cytokine interleukin-4 increases the clonogenic potential of prostate stem-like cells by activation of STAT6 signalling. *Oncogenesis* [Internet]. 2017 May 29;6(5):e342.

183. Погоріла МС. Вплив препарату з ембріональних тканин птахів на динаміку вмісту цитокінів і С-реактивного білку в сироватці крові мишей після дії γ -випромінювання. *Фізіологічний журнал*. 2015;61(2):87-93.

184. Погорелая МС, Жегунов ГФ, Щербак ОН. Уровень сывороточного ИЛ-4 на фоне профилактического применения экстракта из эмбрионов кур при радиационном воздействии. *Материалы XIII Всероссийской молодежной научной конференции Института физиологии Коми научного центра НЦ УрО РАН «Физиология человека и животных: от эксперимента к клинической практике», 22-24 апреля 2014 г., г. Сыктывкар, Республика Коми, Россия*. 2014;115.

185. Погоріла МС, Жегунов ГФ, Щербак ОМ. Рівень ІЛ-6 в сироватці крові мишей на тлі застосування екстракту із курячих ембріонів перед впливом γ -випромінювання. *Матеріали міжнародної науково-практичної конференції «Теоретичні та практичні аспекти розвитку сучасної медицини», 27-28 червня 2014 р., м. Львів*. 2014;93-5.

186. Погоріла МС, Щербак ОМ, Жегунов ГФ. Вплив екстракту курей на рівень фактору некрозу пухлини- α у мишей на фоні радіаційного опромінення. *Матеріали Науково-практичної конференції з міжнародною участю «Актуальні питання біології, екології, медицини та фармакології». 26-27 вересня 2013. Дніпропетровськ*. 2013;85-6.

187. Погоріла МС, Щербак ОМ, Романова ОА. Вплив сублетального γ -випромінювання на рівень ІЛ-1 β в сироватці крові мишей за умови профілактичного застосування екстракту з курячих ембріонів. Матеріали міжнародної науково-практичної конференції «Медична наука та практика: актуальні питання взаємодії», 5-6 вересня 2014 р., м. Київ. 2014;23-5.

188. Погорелая МС, Романова ЕА. Влияние экстракта из эмбриональных тканей птиц на адаптивный иммунитет у мышей при индуцированной иммунодепрессии. Научные ведомости Белгородского государственного университета. Естественные науки. 2015;21(218):65-70.

189. Погорелая МС, Жегунов ГФ, Щербак ОН. Влияние экстракта куриных эмбрионов на состояние нейтрофилов периферической крови мышей после однократного тотального γ -облучения. Вестник Харьковского национального университета имени В.Н. Каразина, серия "Биология. 2012;1035(16):185-91.

190. Погоріла МС, Романова ОА, Сидоренко ТА, Щербак ОМ. Динаміка процесів ПОЛ в кістковому мозку мишей при застосуванні препарату з ембріональних тканин птахів за радіаційно-індукованої імунодепресії. Матеріали міжнародної науково-практичної конференції «Пріоритети сучасної медицини: теорія і практика» 6-7 лютого 2015 р., Одеса. 2015:206-8.

191. Шейбак ЛН. Особенности обеспечения и потребность в аминокислотах в периоде новорожденности. Вестник ВГМУ. 2015;14(2):46-8.

192. Kirkwood JM, Lotze MT, Yasko JM. Current cancer therapeutics. Fourth edition. Springer Science and Business Media; 2013. p. 246-8.

193. Pearce LL, Zheng X, Martinez-Bosch S, Kerr PP, Khlangwiset P, Epperly MW, et al. L-arginine is a radioprotector for hematopoietic progenitor cells. Rad research. 2012 Jun;177(6):792-803.

194. Camell C, Smith CW, Bassaganya-Riera J. Dietary oleic acid increases M2 macrophages in the mesenteric adipose tissue. PLoS One [Internet]. 2013 Sep 30;8(9):e75147.

195. Han SN, Lichtenstein AH, Ausman LM, Meydani SN. Novel soybean oils differing in fatty acid composition alter immune functions of moderately hypercholesterolemic older adults. *J Nutr*. 2012 Dec;142(12):2182-7.
196. MacVittie TJ, Bennett A, Booth C, Garofalo M, Tudor G, Ward A, et al. The prolonged gastrointestinal syndrome in rhesus macaques: the relationship between gastrointestinal, hematopoietic, and delayed multi-organ sequelae following acute, potentially lethal, partial-body irradiation. *Health physics*. 2012 Oct;103(4):427-53.
197. Zhang QS, Benedetti E, Deater M, Schubert K, Major A, Pelz C, et al. Oxymetholone therapy of fanconi anemia suppresses osteopontin transcription and induces hematopoietic stem cell cycling. *Stem Cell Reports*. 2015 Jan 13;4(1):90-102.
198. Krause D, Scadden D, Preffer L. The Hematopoietic Stem Cell Niche – Home for Friend and Foe? *Clinical Cytometry*. 2012 Jan-Feb; 84(1):7-20.
199. Alvarez MB, Xu L, Childress P, et al. Megacaryote and Osteoblast Interaction Modulate Bone Mass and Hematopoiesis [Internet]. *Stem Cells Dev*. 2018 Apr 10.
200. Cheng YH, Chitetti BR, Streicher DA, et al. Impact of maturational status on the ability of osteoblasts to enhance the hematopoietic function of stem and progenitor cells. *J Bone Miner Res*. 2011 May;26(6):1111-21.
201. Chitetti BR, Cheng YH, Streicher DA, et al. Osteoblasts lineage cells expressing high levels of Runx2 enhance hematopoietic progenitor cell proliferation and function. *J Cell Biochem*. 2010 Oct 1;111(2):284-94.
202. Макалиш ТП. Морфофункциональные особенности селезенки при воздействии на организм факторов различного генеза. *Таврический медико-биологический вестник*. 2013;16(1):265-69.
203. Bertho JM, Demarquay C, Mouiseddine M, Douenat N, Stefani J, Prat M. Bone marrow stromal cells spontaneously produce Flt3-ligand: Influence of ionizing radiations and cytokine stimulation. *International Journal of Radiation Biology*. 2008 Aug;84(8):659-67.

204. Kim D, Lee JR, Shen E, Wang SX. Modeling and experiments of magneto-nanosensors for diagnostics of radiation exposure and cancer. *Biomed Microdevices*. 2013 Aug;15(4):665-71.
205. Ossetrova NI, Sandgren DJ, Blakely WF. Protein biomarkers for enhancement of radiation dose and injury assessment in nonhuman primate total-body irradiation model. *Radiat Prot Dosimetry*. 2014 Jun; 159(1–4):61-76.
206. Radiation Proteomics: The effects of ionizing and non-ionizing radiation on cells and tissues. In Leszczynski D, editor. *Advances in Experimental Medicine and Biology*. Springer Science & Business Media; 2013. p. 86-100.
207. Bertho JM, Prat M, Stefani J, Demarquay C, Simon E, Dudoignon N, et al. Correlation between plasma Flt3-ligand concentration and hematopoiesis during G-CSF-induced CD34+ cell mobilization. *Stem Cells Dev*. 2008 Dec;17(6):1221-5.
208. Johns JL, Christopher MM. Extramedullary hematopoiesis: a new look at the underlying stem cell niche, theories of development, and occurrence in animals. *Vet Pathol*. 2012 May;49(3):508-23.
209. Bendall LJ, Bradstock KF. G-CSF: From granulopoietic stimulant to bone marrow stem cell mobilizing agent. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2014 Aug;25(4):355-67.
210. Kulkarni SS, Cary LH, Gambles K, Hauer-Jensen M, Kumar KS, Ghosh SP. Gamma-tocotrienol, a radiation prophylaxis agent, induces high levels of granulocyte colony-stimulating factor. *Int Immunopharmacol*. 2012 Dec;14(4):495-503.
211. Zhang Z, Zhang M, Lv W, Huang L, Yin L, Yang S, et al. Radiation effects the responsiveness of bone marrow to G-CSF. *Adv Exp Med Biol*. 2013;789:273-80.
212. Cox GN, Chlipala EA, Smith DJ, Carlson SJ, Bell SJ, Doherty DH. Hematopoietic properties of granulocyte colony-stimulating factor/immunoglobulin (g-csf/igg-fc) fusion proteins in normal and neutropenic rodents. *PLoS One*. 2014 Mar 17;9(3):e91990.

213. Sproull M, Avondoglio D, Kramp T, Shankavaram U, Camphausen K, et al. Correlation of plasma FL expression with bone marrow irradiation dose. *PLoS One* [Internet]. 2013;8(3):e58558.
214. Kim D, Marchetti F, Chen Z, Zaric S, Wilson RJ, Hall DA, et al. Nanosensor dosimetry of mouse blood proteins after exposure to ionizing radiation. *Sci Rep*. 2013;3:2234.
215. Volpe G, Clarke M, Garcia P, Walton DS, Vegiopoulos A, Del Pozzo W, et al. Regulation of the Flt3 Gene in Haematopoietic Stem and Early Progenitor Cells. *PLoS One* [Internet]. 2015 Sep 18;10(9): e0138257.
216. Tanaka T, Narazaki M, Kishimoto T. IL-6 in inflammation, immunity, and disease. *Cold Spring Harb Persp Biol*. 2014 Sep 4;6(10): a016295.
217. Chen YF, Wu ZM, Xie C, Bai S, Zhao LD. Expression level of IL-6 secreted by bone marrow stromal cells in mice with aplastic anemia. *ISRN Hematol* [Internet]. 2013 Jun 18;986219. Access mode: <http://dx.doi.org/10.1155/2013/986219>.
218. Gilbert LA, Hemann MT. Context-specific roles for paracrine IL-6 in lymphomagenesis. *Genes Dev*. 2012 Aug 1;26(15):1758-68.
219. Chatterjee M, Osborne J, Bestetti G, Chang Y, Moore PS, et al. Viral IL-6-induced cell proliferation and immune evasion of interferon activity. *Science*. 2002 Nov 15;298(5597):1432-5.
220. De Haan G, Weersing E, Dontje B, Van Os R, Bystrykh LV, Vellenga E, et al. In Vitro Generation of Long-Term Repopulating Hematopoietic Stem Cells by Fibroblast Growth Factor-1. *Dev Cell*. 2003 Feb;4(2):241-51.
221. Casey-Sawicki K, Zhang M, Kim S, Zhang A, Zhang SB, Zhang Z, et al. A basic fibroblast growth factor analog for protection and mitigation against acute radiation syndromes. *Health Phys*. 2014 Jun;106(6):704-12.
222. Donnelly EH, Nemhauser JB, Smith JM, Kazzi ZN, Farfán EB, Chang AS, et al. Acute radiation syndrome: assessment and management. *Acute radiation syndrome: assessment and management*. *South Med J*. 2010 Jun;103(6):541-6.

223. Foulds GA, Radons J, Kreuzer M, Multhoff G, Pockley AG. Influence of tumors on protective anti-tumor immunity and the effects of irradiation. *Front Oncol.* 2013 Feb 1;3:14.
224. Manda K, Glasow A, Paape D, Hildebrandt G. Effects of ionizing radiation on the immune system with special emphasis on the interaction of dendritic and T cells. *Front. Oncol.* 2012 Aug 24;2:102.
225. Jang SS, Park WY. The Combined Effects of amifostine and Interleukin 1 Beta (IL-1beta) on Radiation-induced Gastrointestinal and Hematopoietic Injury. *Cancer Res Treat.* 2003 Dec;35(6):528-32.
226. Pyle CJ, Uwadiae FI, Swieboda DP, Harker JA. Early IL-6 signalling promotes IL-27 dependent maturation of regulatory T cells in the lungs and resolution of viral immunopathology. *PLoS Pathog* [Internet]. 2017 Sep 27;13(9):e1006640. eCollection 2017 Sep.
227. Liu H, Li B, Jia X, Ma Y, Gu Y, Zhang P, et al. Radiation-induced decrease of CD8⁺ dendritic cells contributes to Th1/Th2 shift. *Int Immunopharmacol.* 2017 May;46:178-85.
228. Passos ME, Alves HH, Momesso CM, Faria FG, Murata G, Cury-Boaventura MF, et al. Differential effects of palmitoleic acid on human lymphocyte proliferation and function. *Lipids Health Dis.* 2016 Dec 13;15(1):217.

Додаток 1

**СПИСОК НАУКОВИХ ПРАЦЬ, ОПУБЛІКОВАНИХ ЗА ТЕМОЮ
ДИСЕРТАЦІЇ**

Статті у наукових фахових виданнях України:

1. Погорелая МС, Жегунов ГФ, Щербак ОН. Влияние экстракта куриных эмбрионов на состояние нейтрофилов периферической крови мышей после однократного тотального γ -облучения. Вестник Харьковского национального университета имени В.Н. Каразина, серия "Биология. 2012;1035(16):185-91. *(Особистий внесок – здобувачу належить ідея, покладена в основу статті, проведення частини експериментів, оформлення статті).*

2. Погорелая МС, Жегунов ГФ, Щербак ОН. Влияние экстракта куриных эмбрионов на состояние микрофлоры кишечника мышей после однократного тотального γ -облучения. Вестник Харьковского национального университета имени В.Н. Каразина, серия "Биология. 2013;1056(17):185-90. *(Особистий внесок – проведення експериментальних досліджень, написання статті).*

3. Погорелая МС, Жегунов ГФ, Щербак ОН. Влияние экстракта из куриных эмбрионов на количественные изменения в периферической крови мышей вследствие однократного тотального γ -облучения. Вестник Харьковского национального университета имени В.Н. Каразина, серия "Биология". 2013;1079(18):164-71. *(Особистий внесок – проведення експериментальних досліджень, аналіз результатів, написання статті).*

4. Кузнецова ВГ, Погоріла МС, Жегунов ГФ. Дослідження вмісту амінокислот та жирних кислот в екстракті з ембріонів курей. «Вісник проблем біології та медицини». 2014;3(115):60-4. *(Особистий внесок – здобувач є співавтором ідеї, покладеної в основу статті).*

5. Погоріла МС. Вплив препарату з ембріональних тканин птахів на морфологію тимусу мишей за радіаційної імунодепресії. «Вісник проблем біології та медицини». 2015;1(118):98-102. *(Особистий внесок – здобувачу належить ідея,*

покладеної в основу статті, проведення частини експериментальних досліджень, написання статті).

6. Pohorila MS, Popov MM, Romanova OA, Sherbak OM, Martinov AV. Dynamics of hematopoiesis regulators content in bone marrow under the poultry embryonic tissue extract usage for the radiation-caused immune damage correction. Вестник Харьковского национального университета имени В.Н. Каразина, Серия "Биология". 2016;27:131-40. *(Особистий внесок – проведення експериментів, інтерпретація результатів, написання статті).*

7. Погорелая МС, Романова ЕА. Влияние экстракта из эмбриональных тканей птиц на адаптивный иммунитет у мышей при индуцированной иммунодепрессии. Научные ведомости Белгородского государственного университета. Естественные науки. 2015;21(218):65-70. *(Особистий внесок – здобувач є співавтором ідеї, покладеної в основу статті, аналіз отриманих результатів, написання статті).*

8. Погорелая МС. Влияние препарата из эмбриональных тканей птиц на морфологию бедренной кости мышей, подвергнутых действию тотального γ -излучения. Научные ведомости Белгородского государственного университета. Естественные науки. 2015;9(206):73-9. *(Особистий внесок – здобувачу належить ідея, покладеної в основу статті, проведення частини експериментальних досліджень)*

*Статті у наукових виданнях, які входять
до міжнародної наукометричної бази SCOPUS:*

1. Погоріла МС. Вплив препарату з ембріональних тканин птахів на динаміку вмісту цитокінів і С-реактивного білку в сироватці крові мишей після дії γ -випромінювання. Фізіологічний журнал. 2015;61(2):87-93. *(Особистий внесок – здобувачу належить ідея, покладеної в основу статті, проведення експериментів, аналіз результатів).*

Тези наукових доповідей:

1. Михайличенко МС (Погорелая МС), Мершинець ЮО, Жегунов ГФ. Вплив екстракту ембріонів курей на рівень С-реактивного білка у мишей при умові радіаційного опромінення. Збірник наукових робіт частина I «Матеріали XI наукової конференції студентів та молодих учених». 13-15 квітня 2011 р. Дніпропетровськ. 2011;169.

2. Погоріла МС, Щербак ОМ, Жегунов ГФ. Вплив екстракту курей на рівень фактору некрозу пухлини- α у мишей на фоні радіаційного опромінення. Матеріали Науково-практичної конференції з міжнародною участю «Актуальні питання біології, екології, медицини та фармакології». 26-27 вересня 2013. Дніпропетровськ. 2013;85-6.

3. Погоріла МС, Щербак ОМ, Жегунов ГФ. Лізоцим сироватки крові мишей на фоні іонізуючого випромінювання. Матеріали III Международной научной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых. 24-27 февраля 2014 г., г. Донецк. Фундаментальные и прикладные исследования в биологии. 2014;218.

4. Погорелая МС, Жегунов ГФ, Щербак ОН. Уровень сывороточного ИЛ-4 на фоне профилактического применения экстракта из эмбрионов кур при радиационном воздействии. Матеріали XIII Всероссийской молодежной научной конференции Института физиологии Коми научного центра НЦ УрО РАН «Физиология человека и животных: от эксперимента к клинической практике», 22-24 апреля 2014 г., г. Сыктывкар, Республика Коми, Россия). 2014;115.

5. Погоріла МС, Жегунов ГФ, Щербак ОМ. Рівень ІЛ-6 в сироватці крові мишей на тлі застосування екстракту із курячих ембріонів перед впливом γ -випромінювання. Матеріали міжнародної науково-практичної конференції «Теоретичні та практичні аспекти розвитку сучасної медицини», 27-28 червня 2014 р., м. Львів. 2014;93-5.

6. Погоріла МС, Щербак ОМ, Романова ОА. Вплив сублетального γ -випромінювання на рівень ІЛ-1 β в сироватці крові мишей за умови профілактичного застосування екстракту з курячих ембріонів. Матеріали міжнародної науково-практичної конференції «Медична наука та практика: актуальні питання взаємодії», 5-6 вересня 2014 р., м. Київ. 2014;23-5.

7. Погоріла МС, Романова ОА, Щербак ОМ. Оцінка алергізуючих властивостей препарату з ембріональних тканин птахів. Матеріали міжнародної науково-практичної конференції «Сучасні тенденції у медичних та фармацевтичних науках», 5-6 грудня 2014 р., Київ. 2014;119-20.

8. Погоріла МС, Романова ОА, Сидоренко ТА, Щербак ОМ. Динаміка процесів ПОЛ в кістковому мозку мишей при застосуванні препарату з ембріональних тканин птахів за радіаційно-індукованої імунодепресії. Матеріали міжнародної науково-практичної конференції «Пріоритети сучасної медицини: теорія і практика» 6-7 лютого 2015 р., Одеса. 2015;206-8.

9. Погоріла МС, Романова ОА, Щербак ОМ, Сидоренко ТА. Оцінка радіозахисної ефективності застосування препарату з ембріональних тканин птахів за показниками виживаності. Матеріали науково-практичної конференції з міжнародною участю «Щорічні терапевтичні читання: Від досліджень до реалій клінічної практики XXI століття» присвяченій пам'яті академіка Л.Т. Малої 23-24 квітня 2015 року, м. Харків. 2015;234.

10. Романова ОА, Сидоренко ТА, Ігумнова НІ, Юхименко ВІ, Щербак ОМ. Вплив екстракту з ембріональних тканин птахів на формування адаптивного імунітету у мишей за індукованої імунодепресії. Матеріали науково-практичної конференції за участю міжнародних спеціалістів «Актуальні питання боротьби з інфекційними захворюваннями», присвячена 170-й річниці з дня народження І.І. Мечникова, 14-15 травня 2015 р., м. Харків. 2015;77.

11. Погоріла МС, Романова ОА, Сидоренко ТА, Ігумнова НІ, Юхименко ВІ, Щербак ОМ. Вміст FGF β в екстракті з ембріональних тканин птахів.

Міжнародна науково-практична конференція «Проблеми та стан розвитку медичної науки та практики в Україні», 10-11 червня 2016, м. Дніпро. 2016;96-8.