

Міністерство освіти і науки України
Київський національний університет імені Тараса Шевченка

ПОГОРІЛА МАРИНА СЕРГІЇВНА

УДК 612.017.11:612.014.482.4

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

03.00.09 – імунологія

АВТОРЕФЕРАТ

дисертації на здобуття наукового ступеня
кандидата біологічних наук

Київ – 2018

Дисертацією є рукопис

Робота виконана у Державній установі «Інститут мікробіології та імунології імені І. І. Мечникова Національної академії медичних наук України»

Науковий керівник: кандидат біологічних наук
Романова Олена Анатоліївна,
ДУ «Інститут мікробіології та імунології ім.
І.І. Мечникова НАМН України», провідний науковий
співробітник лабораторії та клінічного відділу молекулярної
імунофармакології

Офіційні опоненти: доктор медичних наук, професор,
член-кореспондент НАМН України
Лісяний Микола Іванович,
ДУ «Інститут нейрохірургії
імені академіка А.П. Ромаданова НАМН України»,
завідувач відділу нейроімунології

доктор біологічних наук, професор
Сківка Лариса Михайлівна,
Київський національний університет
імені Тараса Шевченка МОН України,
завідувач кафедри мікробіології та імунології ННЦ
«Інститут біології та медицини»;

Захист відбудеться «21» травня 2018 року о 16⁰⁰ годині на засіданні спеціалізованої вченої ради Д 26.001.24 Київського національного університету імені Тараса Шевченка за адресою: м. Київ, проспект Академіка Глушкова 2, ННЦ «Інститут біології та медицини», ауд. 434

Поштова адреса: 01601, м. Київ, вул. Володимирська, 64/13, Київський національний університет імені Тараса Шевченка, ННЦ «Інститут біології та медицини», спеціалізована вчена рада Д 26.001.24

З дисертацією можна ознайомитись у Науковій бібліотеці ім. М. Максимовича Київського національного університету імені Тараса Шевченка за адресою: м. Київ, вул. Володимирська, 58, зала 12
Автореферат розісланий “ ____ “ _____ 2018 року

Вчений секретар
спеціалізованої вченої ради

Ракша Н.Г.

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

Актуальність теми. Вторинні (набуті) імунодефіцити – широко розповсюджені імунодепресивні стани, спричинені застосуванням лікарських засобів з імуносупресивною активністю (цитостатики, кортикостероїди, опіюїдні 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. [Mwambete K.D., Tunzo J., et al, 2013; Kim Y.C., Barshishat-Kupper M., 2014; Wonagura V.R., 2014; Bright P.D., et al., 2015; Maxfield L., et al., 2018]. Зниження загальної імунної реактивності внаслідок набутого імунодефіциту ініціює низку патологічних станів, що являють собою суттєву загрозу для якості та тривалості життя людини [Ress S., 2014; Duraisingham S.S., et al., 2014]. Наслідками скомпрометованої імунної реактивності є підвищена захворюваність на онкологічну патологію, інфекційні захворювання, метаболічні хвороби та багато інших [Pawelec G., 2017; Rossi AP., et al., 2017; Guaraldi G., 2017].

Імунодепресивні стани різноманітного генезу частіше за все асоціюються з пошкодженням функціонування гемопоетичної системи, відповідальної за диференціювання та вихід у циркуляцію формених елементів крові [Brown G., 2018]. Порушення медулярного гемопоєзу супроводжує пригнічення імунної реактивності з віком [Bulati M., et al., 2017], а також вторинний імунодефіцит, викликаний ВІЛ-інфекцією [Vishnu P., Aboulafia D.M., 2015]. 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 [Reger M.A., Schroeder T., 2012].

Для відновлення супресованої імунної реактивності використовують замісну терапію або неспецифічні імуномодулятори [Drago-Serrano M.E., et al., 2018; Esposito S., et al., 2018]. 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 [Isakov V.A., Isakov D.D., 2015].

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) [Li X., et al., 2012; Morales-Garcia C., et al., 2015]. Препарати з ембріональних тканин здатні активувати проліферацію та диференціювання клітин імунної системи, прискорювати процеси регенерації [Дыгай А.М., Жданов В.В., 2012], посилювати фагоцитарні властивості лейкоцитів,

впливати на інтегральні метаболічні процеси, справляти антистресовий та антитоксичний ефекти [Ржепаковский И.В., Тимченко Л.Д., 2012]. 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) [Bein J., 2010]. Екстракти курячих ембріонів широко застосовуються як джерело факторів диференціювання для культивування *in vitro* нейрональних, нейроепітеліальних та ембріональних стовбурових клітин [Suraeva N.M., et al., 2016]. У медичній практиці екстракти курячих ембріонів застосовуються для відновлення зниженої імунної реактивності у післяпологовому періоді [Li X., et al., 2012]. На тваринних моделях показана здатність екстрактів курячих ембріонів стимулювати репаративні імунні реакції [Chehelcheraghi G., et al., 2015]. 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 IL-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-практичеській конференції с міжнародним участием «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.

ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ

Матеріали та методи дослідження. Дослідження проводили в лабораторії клінічної імунології та алергології, в лабораторії та клінічному відділі молекулярної імунофармакології Державної установи «Інститут мікробіології та імунології ім. І.І. Мечникова Національної академії медичних наук України», м. Харків.

Для контролю якості ЕЕТП 9 відповідно до вимог Державної фармакопеї України здійснювали перевірку на: стерильність та присутність бактеріальних ендотоксинів.

З метою стандартизації зразків ЕЕТП 9 вимірювали концентрацію білка (Bicinchoninic Acid Kit for Protein Determination, “Sigma”, США) та імуноферментним методом – рівень FGFb («Chicken FGF2/Basic FGF ELISA Kit (Sandwich ELISA)» («LifeSpan BioSciences» США) до та після його зберігання в рідкому азоті. Аналіз амінокислот ЕЕТП 9 здійснювали на автоматичному аналізаторі амінокислот ААА-339м фірми «Microtechna», (Чехія), жирних кислот – на газорідному хроматографі «Хром-5». Алергізуючі властивостей ЕЕТП 9 оцінювали за анафілактичним індексом (за Вейглом). Ефекти цільного ЕЕТП 9 та його фракцій оцінювали за впливом на синтез ІЛ-2 спленоцитами *in vitro* та фагоцитарну активність перитонеальних макрофагів, отриманих від мишей з циклофосфамідною імунодепресією (40 мг/кг). Оцінка ефектів ЕЕТП 9 (0,1 мг/кг одноразово, внутрішньочеревинно) здійснювалась *in vivo* в експерименті з 30-ти добової виживаності мишей після дії тотального γ -випромінювання в діапазоні доз 3 – 9 Гр. Для групи мишей, що були опромінені в дозі LD₈₀₋₁₀₀ (9 Гр) розраховували середню тривалість життя. Обчислювали також фактор зміни дози (ФЗД) для ЕЕТП 9. Далі вплив ЕЕТП 9 (0,1 мг/кг 4-разово перед дією γ -випромінювання та одноразово після, внутрішньом'язово) на показники стану гемопоезу та імунної системи вивчали *in vivo* на моделі променевої імунодепресії у мишей (5 Гр). Гістологічне дослідження тимусу, селезінки, кісткового мозку (КМ) проводили на 7 та 14 добу після опромінювання. Далі оцінювали вплив ЕЕТП 9 на показники стану гемо-, імунопоезу та імуногенезу порівняно з препаратами ембріонального походження «Ербісол» на 3, 7, 14, 21, 31 добу після індукції імунодепресії. Групи тварин (по n=11): 1) інтактні миші; 2) миші із радіаційною імунодепресією; 3) миші із застосуванням ЕЕТП 9; 4) миші із застосуванням «Ербісол»; 5) миші із радіаційною імунодепресією та застосуванням ЕЕТП 9; 6) миші із радіаційною імунодепресією та застосуванням «Ербісол». За допомогою гематологічних методів досліджували ефекти ЕЕТП 9 на абсолютне число каріоцитів КМ, селезінки та тимусу, загального числа лейкоцитів та абсолютного числа формених елементів крові. Методами імунофлюоресценції – відносне число CD3⁺ CD4⁺, CD8⁺ CD45R⁺ (анти-мишачі антитіла проти відповідних популяцій «BioLegend», USA) та відносного числа sm^+sm^- та sm^+ клітин у лімфоїдному пулі КМ (анти- μ -ФІТЦ мічена сироватка («Sigma-Aldrich») та зрілих Т-лімфоцитів CD 90.2⁺ (Thy 1.2 («Alexa Fluor® 647 anti-mouse CD90.2⁺ Antibody» («BioLegend», USA). Імунологічними та спектрофотометричними методами визначали рівень продуктів перекисного окиснення ліпідів (ПОЛ) в клітинах КМ, показники фагоцитарної та бактерицидної активності нейтрофілів периферичної крові тощо. Функціональний стан Т-

лімфоцитів оцінювали в спонтанній та фітогемаглютинін-індукованій реакції баласттрансформації лімфоцитів (РБТЛ з ФГА). Рівні сироваткових цитокінів та спонтанної цитокінової продукції, культивованими *in vitro* мієлокаріоцитами вимірювали на 1, 3, 6, 12, 16, 20, 24 год і далі на 3, 7, 14, 21 добу після дії γ -випромінювання. В роботі використовували тест-набори: «Quantikine Mouse Flt3-ligand ELISA» («R&D systems», USA) з чутливістю набору: 5 пг/мл та діапазоном вимірювання: 31,2 – 2000 пг/мл; «Quantikine Mouse G-CSF ELISA Kit» («Thermo Fisher scientific», Austria) з чутливістю: 0,5 пг/мл та діапазоном: 0,5 – 150 пг/мл; «Mouse G-CSF ELISA Kit» («MyBioSource», USA) з чутливістю: 4 пг/мл та діапазоном: 31,2 – 2000 пг/мл; «Mouse IL-6 Mouse ELISA» («Avicera bioscience, Inc.», USA) з чутливістю: 2 пг/мл та діапазоном: 4,0 – 500 пг/мл та «Mouse IL-6 Platinum ELISA» («Thermo Fisher scientific (eBioscience)», Austria) чутливістю – 6,5 пг/мл та діапазоном: 31,3 – 2000 пг/мл. Для визначення рівнів IL-1 β в сироватці крові використовували набір «Mouse IL-1 β /IL-1 beta ELISA Kit» («LifeSpan BioScience», USA), що характеризується чутливістю – 0,49 пг/мл та діапазоном вимірювання: 1,37 – 1000 пг/мл. IL-6 – «Mouse IL-6 Platinum ELISA» («Thermo Fisher scientific (eBioscience)», Austria), чутливістю – 6,5 пг/мл та діапазоном: 31,3 – 2000 пг/мл та «Mouse IL-6 High Sensitivity ELISA Kit» («Thermo Fisher scientific (eBioscience)», Austria), чутливістю – 0,21 пг/мл та діапазоном: 1,56 – 100 пг/мл. IL-4 – «Mouse IL-4 Platinum ELISA» («Thermo Fisher scientific (eBioscience)», Austria), чутливістю – 2 пг/мл, діапазоном: 3,9 – 250 пг/мл та «Mouse IL-4 High Sensitivity ELISA Kit» («Thermo Fisher scientific (eBioscience)», Austria), з чутливістю – 0,32 пг/мл та діапазоном: 0,63 – 40 пг/мл. Титри специфічних антитіл на 14 та 30 добу після імунізації противірусною вакциною мишей визначали у реакції гальмування гемаглютинації. Статистичний аналіз даних проводили за допомогою комп'ютерних програм Origin (перевірка на нормальність розподілу) та Statistica 6.0 (параметричний метод: t-розподілу) з поправкою Бонферроні. Результати представлені у вигляді середнього арифметичного (M) із лінійним відхиленням (σ). Для титрів специфічних антитіл наводили також коефіцієнт варіації (cv).

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

ЕЕТП 9 містить (0,77 \pm 0,05) мг/мл білка, концентрація якого після зберігання в рідкому азоті статистично вірогідно не змінюється. Рівень FGF β в ЕЕТП 9 склав (120 \pm 6,8) нг/мл, який також достовірно не змінювався після кріовпливу.

За дослідження амінокислот в ЕЕТП 9, було показано домінування аргініну (17,25 \pm 0,76) мг/100 мл, фенілаланіну (17,81 \pm 0,52) мг/100 мл, а також тирозину (9,45 \pm 0,22) мг/100 мл і лейцину (8,17 \pm 0,23) мг/100 мл. Серед жирних кислот у складі ЕЕТП 9 переважали 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. Подібний репертуар аміно- та жирних кислот було показано у роботах з дослідження курячих ембріонів розвитку 6-11 діб [Sun H. et al., 2014; Xi L., 2014].

Далі досліджували ефекти ЕЕТП 9 та його окремих фракцій в експериментах *in vitro* на клітини імунної системи, отримані від мишей з циклофосамідною

імунодепресією. Виділені спленічні лейкоцити та перитонеальні макрофаги обробляли ЕЕТП 9 в концентрації 500 мкг/мл впродовж 48 год, після чого аналізували продукцію ІЛ-2 спленічними лейкоцитами та фагоцитарну активність макрофагів. Встановлено, що цільний ЕЕТП 9 справляє більш виразний імуномодулювальний вплив порівняно із його окремими фракціями: підвищує у 2,3 раза рівень продукції ІЛ-2 спленічними лейкоцитами порівняно із контролем, жиророзчинна фракція сприяла підвищенню в 2 раза, водорозчинна – в 1,7 раза. Зареєстровано підвищення в 1,7 раза фагоцитарного індексу макрофагів за дії цільного ЕЕТП 9 *in vitro*, що переважало ефекти від впливу як водорозчинної, так і жиророзчинної фракції (збільшення у 1,5 та 1,2 раза відповідно).

За дослідження анафілактичної активності ЕЕТП 9 індекс анафілатоксії у тварин, яким його було введено в дозі 0,1 мг/кг, склав 0,2. При збільшенні дози у 10 разів – 0,5. У тварин, яким вводили овальбумін, індекс реакції був 3,6. Отримані результати свідчать про алергічну безпеку ЕЕТП 9.

Далі вивчали вплив ЕЕТП 9 на виживаність тварин після дії зовнішнього, тотального γ -випромінювання в діапазоні доз 3 – 9 Гр. Одноразове внутрішньочеревне введення ЕЕТП 9 мишам в дозі 0,1 мг/кг за добу перед дією γ -випромінювання зрушило $LD_{50/30}$ з 6 Гр до 7 Гр. Фактор зміни дози для ЕЕТП 9, таким чином, склав 1,16. Застосування ЕЕТП 9 забезпечило 38,1 % виживаність мишей протягом 30-ти діб після опромінювання в дозі LD_{80-100} (9 Гр) порівняно з групою контролю, де спостерігалася 100 % летальність (рис. 1).

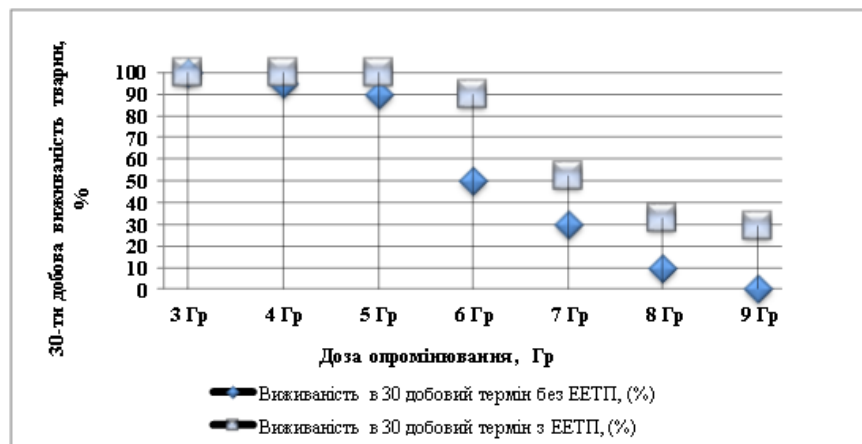


Рис. 1. 30-ти добова виживаність мишей, що були піддані дії γ -випромінювання в діапазоні доз 3 – 9 Гр, за одноразового внутрішньочеревного введення ЕЕТП 9 в дозі 0,1 мг/кг за добу до опромінювання.

Для подальшої роботи була обрана доза γ -випромінювання 5 Гр, за дії якої зберігається високий рівень виживаності, але формується низка стійких кількісних та функціональних порушень показників стану гемопоезу та імунної системи. ЕЕТП 9 вводили внутрішньом'язово 4-разово з інтервалом в 1 добу перед дією γ -випромінювання в дозі 5 Гр та 1-разово після нього в дозі 0,1 мг/кг (сумарно 0,5 мг/кг). Гістологічне дослідження кісткового мозку, тимусу та селезінки проводили в на 7 та 14 добу після дії γ -випромінювання.

На 7 добу після індукції імунодепресії було зареєстровано витончення і резорбцію кісткової тканини з особливо виразними структурними перебудовами стромального мікрооточення, які проявлялися в гіпоплазії гемопоетичної тканини. Відзначалося зниження активності остеогенезу, значне зменшення кількості остеобластів (рис. 2), які, як відомо, регулюють процеси гемопоезу шляхом секреції цитокінів-стимуляторів проліферації стовбурових кровотворних клітин [Alvarez M.V., Xu L., et al., 2018]. Характерним було також хаотичне скупчення гемопоетичних клітин у стромі стегнової кістки, а також збільшення кількості адипоцитів, які на відміну від остеобластів, є інгібіторами гемопоезу [Robles H., Park S., et al., 2018].

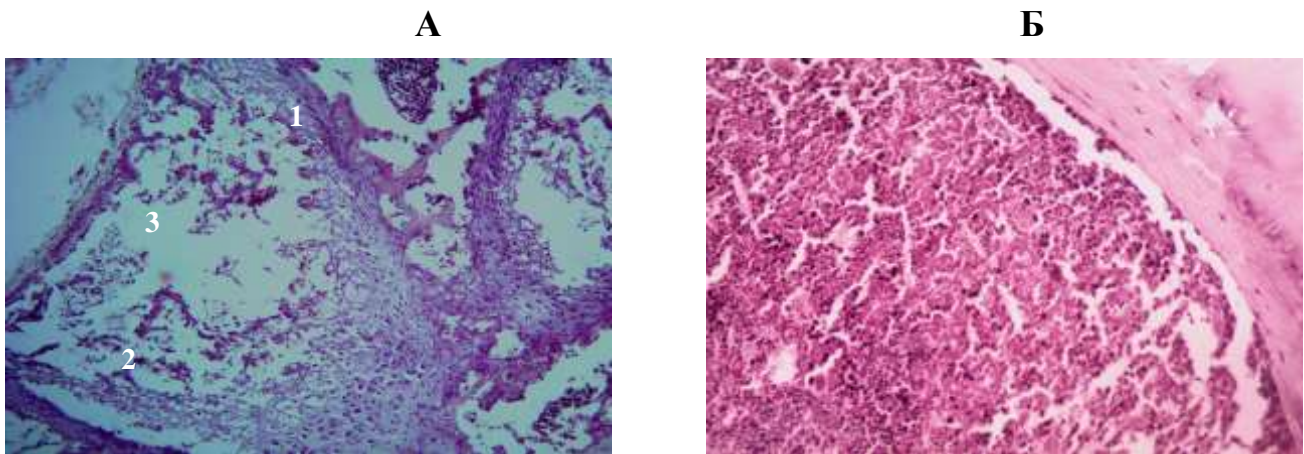


Рис. 2. А: Гістологічний препарат стегнової кістки миші із радіаційною імунодепресією (7 доба). Дистрофічно змінені кісткові трабекули (1), кістковомозкова порожнина (2), гіпоплазія гемопоетичної тканини (3). Забарвлення: гематоксилін та еозин $\times 200$. Б: Гістологічний препарат стегнової кістки мишей із радіаційною імунодепресією за застосування ЕЕТП 9 (7 доба). Ущільнена структура кісткової тканини. Забарвлення: гематоксилін та еозин $\times 200$, $\times 400$.

Застосування ЕЕТП 9 мишам дозволило уникнути витончення структури та порушення кровопостачання кісткової тканини стегнової кістки, а також ознак дистрофії строми та паренхіми КМ (рис. 2Б). У мишей з радіаційною імунодепресією, яким вводили ЕЕТП 9, на 7 добу спостереження кісткові трабекули губчастої кістки були значно ширшими порівняно з контролем. У кістковій тканині було виявлено велику кількість остеобластів, що свідчить про ініціювання активного остеогенезу і процесів кровотворення в КМ, що підтверджувалося також значним переважанням кількості бластних форм над більш диференційованими клітинами КМ (рис. 2Б). На 14 добу у групі тварин, яким вводили ЕЕТП 9, порівняно з контролем, з боку кістково-мозкової порожнини не виявлялося поглиблень і виїмок в компактній тканині діяфізу. В цілому структура кісткової тканини у групи мишей із застосуванням ЕЕТП 9 мала нормальну будову, не відзначалось ознак зменшення ретикулярної тканини зі сполучнотканинним заміщенням. Аналіз морфології селезінки у тварин з радіаційною імунодепресією та тварин, яким вводили ЕЕТП 9 на її фоні, показав наступне. На 7 добу просвіт вен у пульпі селезінки дослідних

тварин був розширений, однак агрегація формених елементів, на відміну від контрольних мишей, не виявлялася. Судинна стінка вен і артерій не мала ознак набряку, гладком'язові клітини чітко забарвлювались гематоксином. Співвідношення білої і червоної пульпи було зрушене в бік білої, але не настільки виразне, як у контролі. Число гранулоцитів і мегакаріоцитів також було вище у білій пульпі селезінки тварин, що отримали ЕЕТП 9, порівняно з контролем, поряд зі значним зменшенням числа гермінативних центрів. На 14 добу у групі тварин, що отримали ЕЕТП 9, прогресивно зростала кількість мегакаріоцитів – маркерів компенсаторної реакції організму. У маргінальній ділянці органу відзначалася велика кількість нейтрофілів на протизагу контрольній групі. Незважаючи на те, що кровонаповнення селезінки нормалізувалося не повністю, виразних крововиливів, порівняно з контрольною групою, виявлено не було.

На гістологічних препаратах тимусу тварин, що отримали ЕЕТП 9, на 7 добу відзначено збільшення розмірів кіркової ділянки. Чітко диференціювалася межа між кірковою та мозковою ділянками, а також епітеліальний мережевий остов залози. На цей час у тимусі тварин цієї групи були виявлені регенераційні процеси, про що свідчила активна проліферація лімфобластів і зменшення кількості тілець Гассала в середній частині мозкової речовини порівняно з контролем. На 14 добу у групі із застосуванням ЕЕТП 9 між- та внутрішньодолькові артерії тимусу були менш розширеними ніж у контролі. Чітко диференціювалися ендотеліальні клітини багаточисельних гемокапілярів, які, як відомо, утворюють гематотимічний бар'єр, необхідний для формування коректного репертуару Т-клітин організму у процесі їх диференціювання [Franckaert D., Schlenner S.M., et al., 2015].

У разі застосування ЕЕТП 9 число каріоцитів КМ не зазнало такого значного зниження, як у тварин із імунодепресією. На 1 добу спостереження цей показник у тварин, що отримали ЕЕТП 9, становив 58,3 % від норми, а на 14 добу – не мав достовірної відмінності від інтактних мишей.

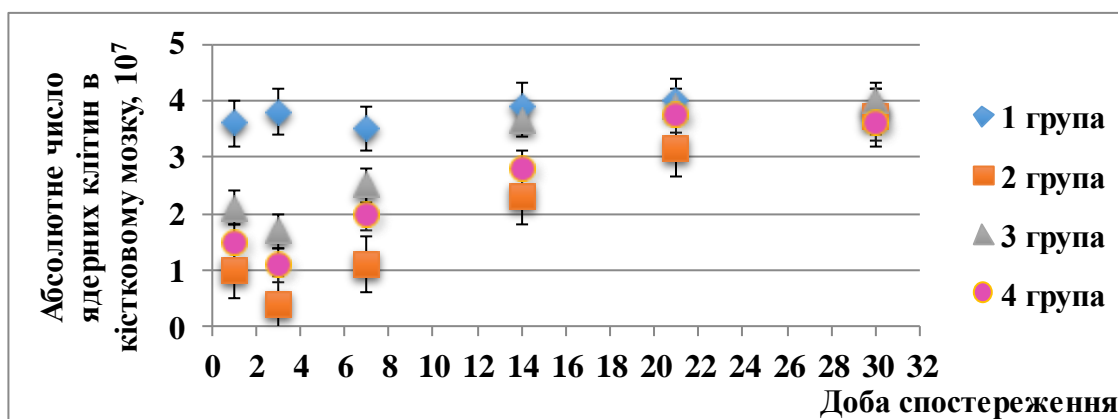


Рис. 3. Абсолютне число каріоцитів кісткового мозку мишей із радіаційною імунодепресією за впливу ЕЕТП 9: 1 – інтактні тварини (n=11), 2 – імунодепресія (n=11); 3 – імунодепресія + ЕЕТП 9 (n=11); 4 – імунодепресія + «Ербісол» (n=11).

У контрольних тварин з імунодепресією цей показник залишався вдвічі нижчим за такий у інтактних мишей.

Повне відновлення загального числа каріоцитів КМ за застосування препарату порівняння «Ербісол» відбувалося лише на 21 добу спостереження (рис. 3).

Порівняльний аналіз популяційного складу лімфоїдних клітин різного ступеню зрілості у КМ тварин з радіаційною імунодепресією показав наступне. Під дією ЕЕТП 9 реєструється достовірно менша втрата числа каріоцитів різного ступеню зрілості в КМ мишей у ранні строки після індукції імунодепресії. Так, на 3 добу спостереження відносне число sm^+ -клітин в КМ за застосування ЕЕТП 9 склало 64,2 % від рівня у інтактних тварин порівняно з 20,7 % у тварин з імунодепресією, та 28,4 % - у разі застосування «Ербісол». Число sm^+sm^- -клітин, більш зрілих В-лімфоцитів КМ, за впливу ЕЕТП 9 збереглося на 3 добу спостереження на рівні, що складав 65,4 % від інтактних тварин. У той же час за застосування препарату порівняння цей показник склав лише 36 % від норми. Відносне число sm^+ та sm^+sm^- -клітин нормалізувалося на 14 добу після індукції імунодепресії у разі застосування ЕЕТП 9, коли у групи із застосуванням «Ербісол» ці показники були зниженими в 1,7 та 1,8 разів відповідно, а досягали норми на 21 добу.

Фізіологічний рівень відносного числа $CD\ 90.2^+$ в КМ під впливом екстракту та препарату порівняння встановлювався синхронно, а саме на 7 добу. У мишей з імунодепресією без використання реконститутивних засобів цей показник був зниженим на 7 добу спостереження у 3,2 раза порівняно з інтактними тваринами.

Таким чином, застосування ЕЕТП 9 мишам дозволяє досягти у більш короткий термін повної нормалізації відносного числа В-лімфоцитів різного ступеню зрілості у КМ у порівнянні із застосуванням препарату порівняння. Відновлення фізіологічного рівня відносного числа $CD90.2^+$ -клітин у КМ тварин із імунодепресією за застосування ЕЕТП 9 та «Ербісолу» відбувається синхронно на 7 добу спостереження.

Спираючись на відомості щодо ролі деяких цитокінів у процесах гемопоезу [Gilbert L.A. 2012, Casey-Sawicki K., 2014], наступним завданням роботи було дослідити їх синтез клітинами КМ тварин з радіаційною імунодепресією, які отримали ЕЕТП 9, культивованими *in vitro*.

У мишей, які отримали ЕЕТП 9, на 1 добу після індукції імунодепресії реєструвалися достовірно більш високі рівні G-CSF в супернатанті клітин КМ, культивованих *in vitro*, ніж у групи тварин, що отримали препарат порівняння, із нормалізацією цього показника на 7 добу спостереження. У мишей групи порівняння та контролю рівні G-CSF з 3 по 14 добу спостереження були нижчими за поріг діапазону вимірювання тест-системи (рис. 4).

У мишей, що отримали ЕЕТП 9, у період з 1 год по 3 добу спостереження зареєстровано посилення продукції ІЛ-6, порівняно з тваринами без застосування реконститутивних препаратів (рис. 5).

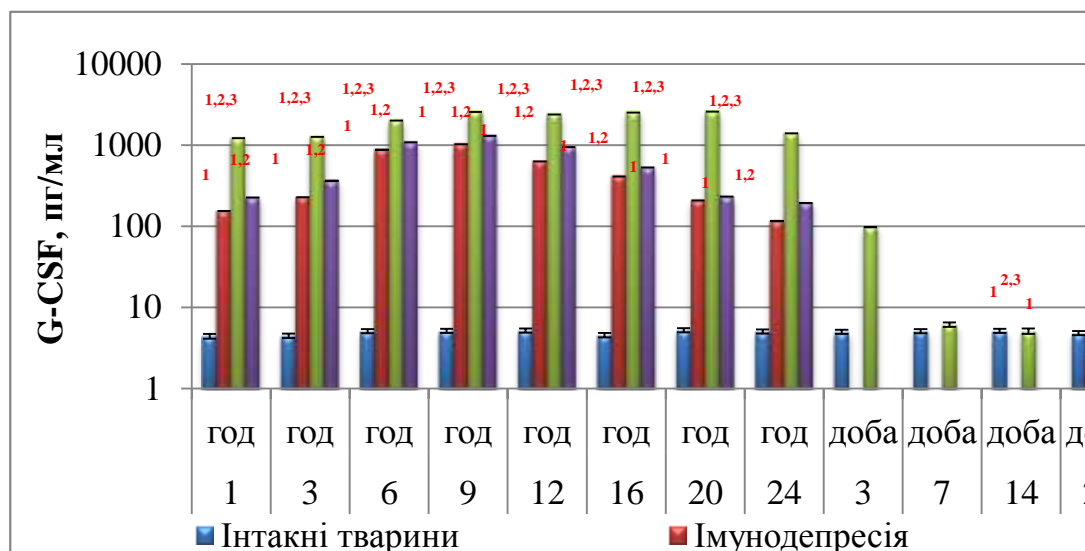


Рис. 4. Концентрація G-CSF в супернатанті клітин кісткового мозку, культивованих *in vitro*, мишей із радіаційною імунодепресією за застосування ЕЕТП 9 ($M \pm m$, $n=11$): ¹ – достовірність відносно контрольної групи; ² – достовірність відносно групи з імунодепресією; ³ – достовірність відносно «Ербісол», $p \leq 0,05$.

У мишей, що отримали ЕЕТП 9, у період з 1 год по 3 добу спостереження зареєстровано посилення продукції ІЛ-6, порівняно з тваринами без застосування реконститутивних препаратів (рис. 5). Пік збільшення цього показника (у 3,1 раза більше, ніж у контролі) припав на 12 год після пошкоджуючого впливу. У період з 12 год по 3 добу відбувалося поступове зниження його продукції зі збереженням значного переважання порівняно з тваринами, які не отримували ЕЕТП 9. З 3 доби і до кінця терміну дослідження спостерігалася його нормалізація в той час, як у групі мишей без застосування ЕЕТП 9 подібної картини не відзначалося.

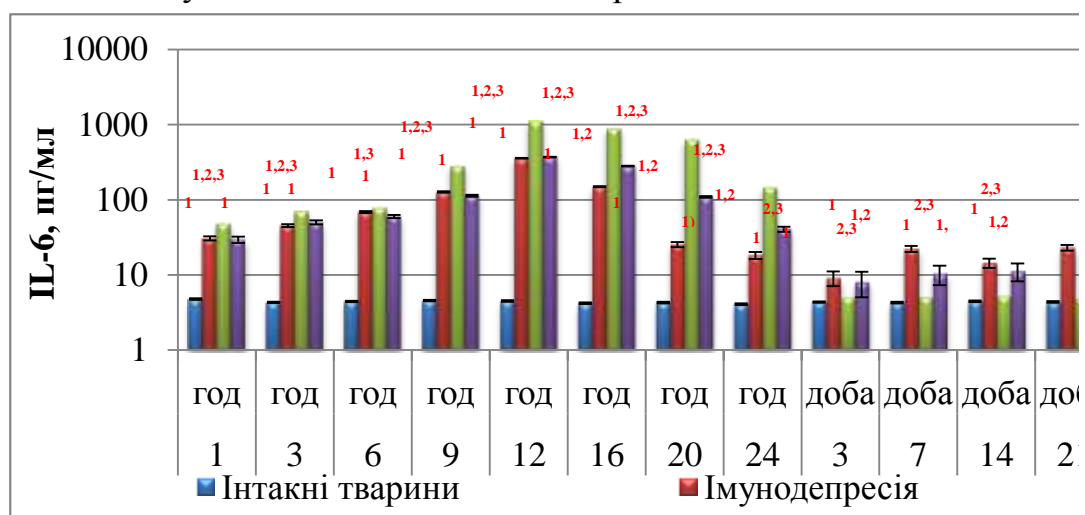


Рис. 5. Концентрація ІЛ-6 в супернатанті клітин КМ мишей із радіаційною імунодепресією за впливу ЕЕТП 9, культивованих *in vitro*, ($M \pm m$, $n=11$): ¹ – достовірність відносно контрольної групи; ² – достовірність відносно групи з імунодепресією; ³ – достовірність відносно препарату порівняння, $p \leq 0,05$.

Під впливом ЕЕТП 9 рівень Flt3-ligand у мишей із радіаційною імунодепресією в перші години спостереження не зазнавав виразного підйому, який спостерігався у контрольних тварин. На 3 добу цей показник у тварин, що отримували ЕЕТП 9, досягав фізіологічного рівня. Натомість, у групі порівняння подібний ефект не виявлено (рис. 6).

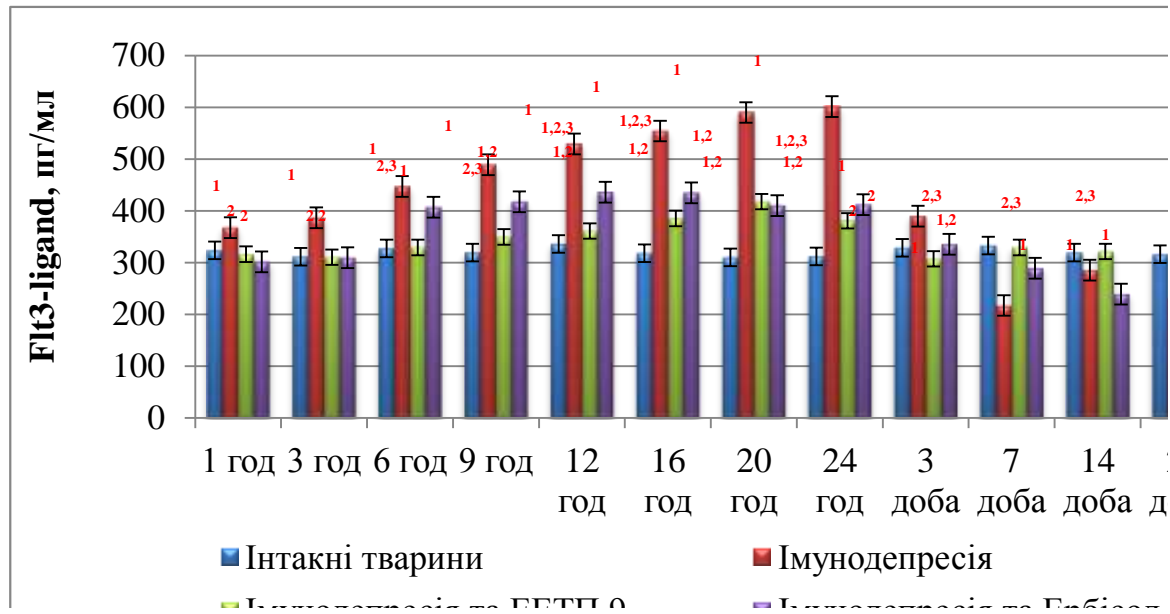


Рис. 6. Концентрація Flt3-ligand в супернатанті клітин КМ мишей із радіаційною імунодепресією за впливу ЕЕТП 9, культивованих *in vitro*, ($M \pm m$, $n=11$): ¹ – достовірність відносно контрольної групи; ² – достовірність відносно групи з імунодепресією; ³ – достовірність відносно препарату порівняння, $p \leq 0,05$.

Застосування препарату порівняння також супроводжувалося помірною реконституцією синтезу цитокінів клітинами КМ тварин з імунодепресією, однак значно меншою мірою, ніж у тварин, що отримували ЕЕТП 9, і у більш пізні терміни.

Таким чином, застосування ЕЕТП 9 завдяки стимуляції в перші години після ушкоджуючого впливу спектру позитивних регуляторів кровотворення, рівні яких вимірювались в супернатанті клітин кісткового мозку, культивованих *in vitro*, сприяє успішному та більш швидкому відновленню гемопоєзу, що створює у свою чергу передумови для ефективного імуногенезу. Позитивний вплив ЕЕТП 9 на синтез регуляторів гемопоєзу, може бути зумовлений здатністю присутнього у його складі фактора росту фібробластів (FGFb) регулювати активність стромальних клітин КМ. Відомо, що FGFb відіграє центральну роль в регулюванні проліферації та диференціювання клітин КМ *in vivo* [Gabbianelli M. et al., 1990; Han G. et al., 2003] та *in vitro* [Okunieff P. et al., 2008]. FGF не тільки безпосередньо стимулює проліферацію кровотворних клітин та клітин строми КМ [Gallicchio V.S. et al., 1990], а й модулює продукцію цитокінів строми КМ, зокрема, IL-6 [Berardi A.C. et al., 1995].

Рівень первинних та вторинних продуктів перекисного окиснення ліпідів в каріоцитах кісткового мозку за впливу ЕЕТП 9 досягає фізіологічних на 14 добу після індукції імунодепресії, поряд з його перевищенням на 30 % на цей термін у групі, що отримувала «Ербісол».

Нормалізація абсолютного числа лейкоцитів, лімфоцитів та гранулоцитів у периферичній крові тварин з імунодепресією за дії ЕЕТП 9 відбувалася на 14 добу спостереження, еритроцитів та тромбоцитів – на 21, що на 7 діб випереджало аналогічні ефекти під дією «Ербісолу».

Дослідження динаміки відновлення відносного числа $CD3^+$, $CD4^+$, $CD8^+$ та $CD45R^+/B220^+$ лімфоцитів периферичної крові виявило розбіжності у термінах нормалізації зазначених показників при порівнянні обох засобів лише щодо субпопуляції $CD45R^+/B220^+$ лімфоцитів. За дії екстракту відносне число В-лімфоцитів досягало фізіологічного рівня на 14 добу, коли у групі порівняння цей показник залишався на 16 % нижчим за норму (рис.7).

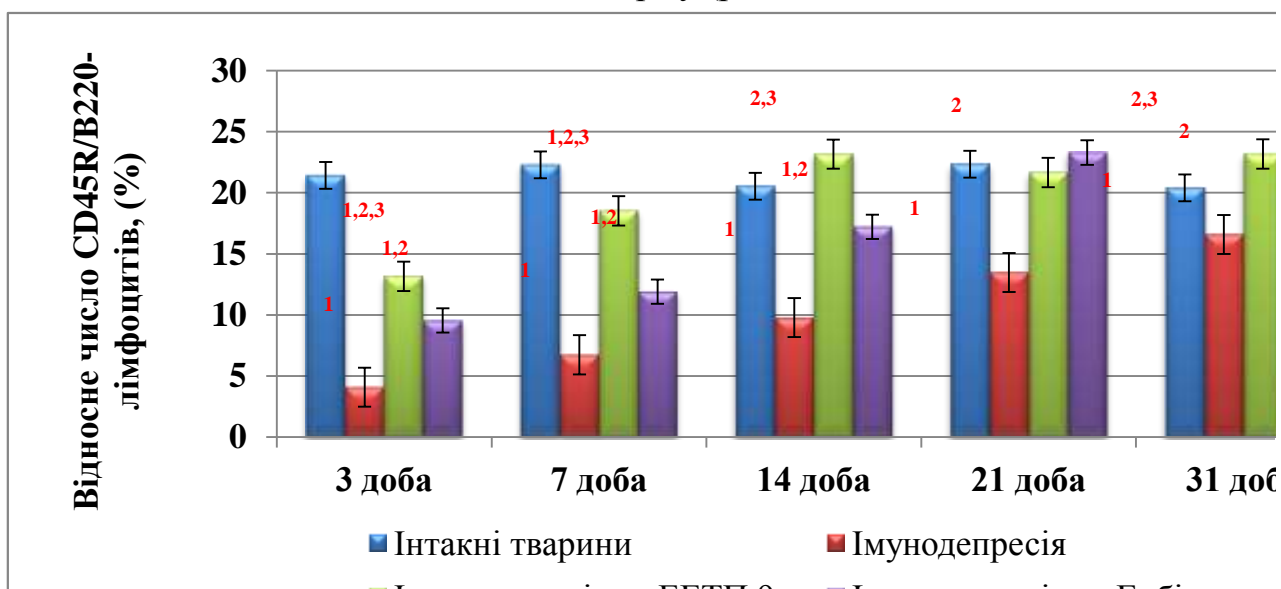


Рис. 7. Відносне число $CD45R/B220$ -лімфоцитів периферичної крові мишей із радіаційною імунодепресією за застосування ЕЕТП 9 ($M \pm m$, $n=11$): ¹ – достовірність відносно контрольної групи; ² – достовірність відносно групи з імунодепресією; ³ – достовірність відносно препарату порівняння, $p \leq 0,05$.

Фагоцитарний індекс нейтрофілів у мишей з імунодепресією, які отримали ЕЕТП 9 та препарат порівняння, досяг фізіологічних значень на 14 добу спостереження. У контрольних тварин цей показник залишався в 1,6 раза ніж у інтактних мишей. Фагоцитарне число за дії ЕЕТП 9 відновлювалося до значень інтактних тварин на 21 добу, а під впливом «Ербісол» воно залишалося зниженим в 1,2.

Різною була й динаміка відновлення функціональної недостатності Т- та В-лімфоцитів у тварин з імунодепресією за дії екстракту та препарату порівняння.

Застосування ЕЕТП 9 сприяло нормалізації рівня спонтанної РБТЛ на 21 добу спостереження. У мишей без застосування засобів реконституції цей показник

залишався зниженим в 1,9 раза, а повна його нормалізація відбувалася лише на 31 добу. Препарат порівняння викликав відновлення проліферативної активності Т-клітин лише на 31 добу експерименту.

Функціональний стан В-клітин у мишей із радіаційною імунодепресією характеризували за їх здатністю до синтезу антитіл після імунізації вакциною проти вірусу грипу «Inflexal V». Встановлено, що інтактні тварини за введення ЕЕТП 9 відповідають утворенням вищих в 1,8 разів порівняно з контролем титрів специфічних антитіл із коефіцієнтом варіації, що не перевищує такий у інтактних мишей. У тварин із радіаційною імунодепресією було зареєстровано нижчі порівняно з інтактними тваринами у 4,1 раза титри антитіл на 14 добу і в 5,7 разів - на 30 добу після вакцинації (рис. 8).

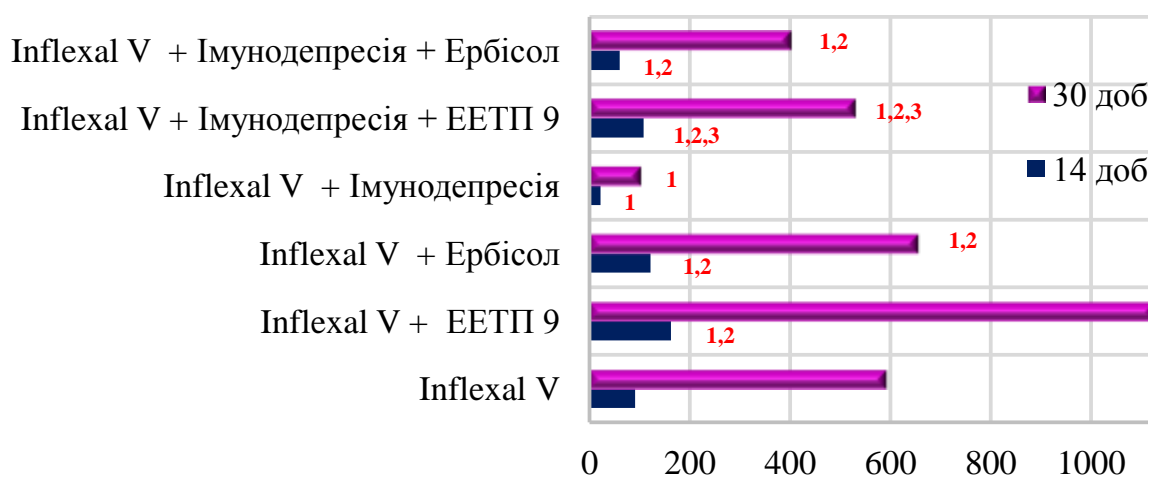


Рис.8. Середньгеометричні титри специфічних антитіл до антигенів вірусу грипу А Н1Н1, Н3Н2 та вірусу грипу В на 14 та 30 добу після імунізації вакциною «Inflexal V» мишей із радіаційною імунодепресією за застосування ЕЕТП 9: ¹ – достовірність відносно контрольної групи; ² – достовірність відносно групи з імунодепресією; ³ – достовірність відносно препарату порівняння, $p \leq 0,05$.

Застосування ЕЕТП 9 у тварин з радіаційною імунодепресією сприяє більш стабільному поствакцинальному антитілогенезу ($cv \leq 30,0$ в порівнянні з $cv \geq 42,02$, який перевищує значення у мишей із імунодепресією на 14 добу у 5 разів, на 30 добу – у 6,2 раза. На відміну від цього, препарат порівняння спричиняє підвищення СГТ антитіл на 14 добу після вакцинації у 2,7 разів та у 3,8 разів - на 30 добу.

Застосування ЕЕТП 9 викликає значне підвищення вмісту ІЛ-1 β та ІЛ-6 в сироватці крові на 1 добу після індукції імунодепресії зі стабілізацією, що реєструється вже на 24 год та 3 добу відповідно. Характерним ефектом застосування ЕЕТП 9 за набутої 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 добу спостереження на фізіологічному рівні.

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-, імуноез 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 ЕЕТП9 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 кісткомозкової 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, ІЛ-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 ІЛ-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 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, постановка реакції фагоцитозу, аналіз результатів, 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 – постановка експерименту, 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

національного університета імени В.Н. Каразіна, серія "Біологія". 2013;1079(18):164-71. *(Особистий внесок – підрахунок лейкограм, 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, постановка експерименту, виділення органів, 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 національного університета імени В.Н. Каразіна, Серія "Біологія". 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 – постановка експерименту, виділення кісткового мозку, культивування клітин, визначення цитокінів, 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, постановка експерименту, виділення органів)*

*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 білка в сироватці крові мишей після дії γ -випромінювання. Фізіологічний журнал. 2015;61(2):87-93. *(Особистий внесок – здобувачу належить ідея, покладеної в основу статті, визначення цитокінів, аналіз результатів).*

Основні тези наукових доповідей:

1. Михайличенко МС (Погорелая МС), Мершинцев 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». м. 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». м. Дніпропетровськ. 2013;85-6.
 3. Погоріла МС, Щербак ОМ, Жегунов ГФ. Лізоцим сироватки крові мишей на фоні іонізуючого випромінювання. Материалы III Международной научной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых. 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. Материалы XIII Всероссийской молодежной научной конференции Института физиологии Коми научного центра НЦ УрО РАН «Физиология человека и животных: от эксперимента к клинической практике», 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», 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», 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», 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», 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, 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, м. Харків. 2015;77.

11. 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», м. Дніпро. 2016;96-8.

АНОТАЦІЯ

Погоріла М.С. Імуномодуляторні властивості екстракту з ембріональних тканин птахів 9-ти діб розвитку за індукованої імунодепресії. – Рукопис.

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.09. – імунологія. – 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.

В ході роботи отримано, що в ЕЕТП 9 концентрація білка становить $0,77 \pm 0,05$ мг/мл, рівень FGFb – $120 \pm 6,8$ нг/мл. Цільний ЕЕТП9 справляє більш виразний стимулювальний вплив *in vitro*, ніж окремі його фракції за показниками рівня синтезу ІЛ-2 спленоцитами та фагоцитарної активності макрофагів мишей із циклофосфамідною імунодепресією. Застосування ЕЕТП 9 мишам в дозі 0,1 мг/кг перед дією γ -випромінювання (3 – 9 Гр) підвищує виживаність мишей протягом 30 діб. За імунодепресії (5 Гр) ЕЕТП 9 прискорює відновлення морфології кісткового мозку, тимусу та селезінки порівняно зі спонтанною реконституцією. Під дією ЕЕТП 9 нормалізується абсолютне число клітин кісткового мозку та популяційний склад його лімфоїдного компартменту вже на 14 добу, тимоцитів та каріоцитів селезінки – на 21 добу, що випереджає їх реконституцію за дії «Ербісол». Частка $CD3^+$, $CD4^+$, $CD8^+$ у груп із застосуванням ЕЕТП 9 та «Ербісол» досягає фізіологічних значень на 7 добу, частка CD45R/B220-лімфоцитів – на 14 добу та 21 добу відповідно. Під впливом ЕЕТП 9 відновлюється функціональна активність Т-, В-лімфоцитів та нейтрофілів крові у тварин з імунодепресією на 7 діб раніше ніж у групи порівняння. Реєструється достовірно вищий рівень антитілогенезу у мишей із імунодепресією за дії ЕЕТП 9. Також ЕЕТП 9 підвищує концентрацію G-CSF, ІЛ-6 та знижує концентрацію Flt3-ligand більшою мірою порівняно з контролем, із нормалізацією на 7 добу. Реєструється збільшення рівнів сироваткових ІЛ-1 β , ІЛ-6 та ІЛ-4 у мишей впродовж 1 доби після індукції імунодепресії із нормалізацією на 7 добу, тоді як за дії «Ербісол» цього не спостерігається до закінчення експерименту.

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

АННОТАЦІЯ

Погорела М.С. Иммуномодулирующие свойства экстракта из эмбриональных тканей птиц 9-ти суток развития при индуцированной иммунодепрессии. - Рукопись.

Диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.00.09. - иммунология. - Киевский национальный университет имени Тараса Шевченко МОН Украины, Киев, 2018.

Диссертация посвящена исследованию эффектов экстракта из эмбриональных тканей птиц 9-ти суток развития на процессы гемо-, иммунопоеза и иммуногенеза при индуцированной иммунодепрессии.

В ходе работы получено, что в ЭЭТП 9 концентрация белка составляет $0,77 \pm 0,05$ мг/мл, уровень FGFb – $120 \pm 6,8$ нг/мл. Цельный ЭЭТП 9 производит большее стимулирующее влияние *in vitro*, чем отдельные его фракции, по показателям уровня синтеза IL-2 спленоцитами и фагоцитарной активности макрофагов мышей с циклофосамидной иммунодепрессией. Применение ЭЭТП 9 мышам в дозе 0,1 мг/кг перед действием γ -излучения (3 – 9 Гр) повышает выживаемость мышей в течение 30 суток. При иммунодепрессии (5 Гр) ЭЭТП 9 ускоряет восстановление морфологии костного мозга, тимуса и селезенки по сравнению со спонтанной реконституцией. Под действием ЭЭТП 9 нормализуется абсолютное число клеток костного мозга и популяционный состав его лимфоидного компартмента на 14 сутки, тимоцитов и кариоцитов селезенки – на 21 сутки, что опережает их реконституцию под действием «Эрбисол». Нормализация доли CD3⁺, CD4⁺, CD8⁺ в группах с применением ЭЭТП 9 и «Эрбисол» происходит на 7 сутки, доли CD45R/B220-лимфоцитов – на 14 и 21 сутки соответственно. Под влиянием ЭЭТП 9 восстанавливается функциональная активность Т-, В-лимфоцитов и нейтрофилов крови у животных с иммунодепрессией на 7 суток раньше чем в группе сравнения. Регистрируется достоверно более высокий уровень антителогенеза у мышей с иммунодепрессией при применении ЭЭТП 9. Также ЭЭТП 9 повышает концентрацию G-CSF, IL-6 и снижает концентрацию Flt3-ligand в большей степени по сравнению с контролем, с нормализацией на 7 сутки. Регистрируется увеличение уровней сывороточных IL-1 β , IL-6 и IL-4 у мышей в течение 1 суток после индукции иммунодепрессии с нормализацией на 7 сутки, тогда как при действии «Эрбисол» не наблюдается до окончания эксперимента.

Ключевые слова: экстракт из эмбриональных тканей птиц 9-ти суток развития, индуцированная иммунодепрессия, иммуномодуляция, функциональное состояние иммунной системы.

SUMMARY

Pohorila M. Immunomodulating properties of embryonic tissues of birds extract of 9 days of fetation with induced immunodepression. - Manuscript.

Thesis for obtaining of the scientific degree of Candidate of Biological sciences in specialty 03.00.09. - immunology. – Taras Shevchenko National University of Kyiv Ministry of Education and Science of Ukraine, Kyiv, 2018.

The thesis is devoted to the study of the effects of the embryonic tissues of birds extract of the 9th day of fetation on the processes of hemo-, immunopoiesis and immunogenesis in induced immunodepression.

In the course of the work it was found that in the embryonic tissues of birds extract of 9 days of fetation the concentration of protein is $0,77 \pm 0,05$ mg/ml, the level of FGFb - $120 \pm 6,8$ ng/ml which were used as the criteria for its standardization. It has been found that a single ETE 9 produces a greater stimulating effect *in vitro* than individual hydrophilic and hydrophobic fractions: on indicators of synthesis of IL-2 by splenocytes and the phagocytic activity of macrophages of mice with cyclophosphamide immunosuppression. A single administration of ETE 9 to mice at a dose of 0,1 mg/kg a day before the action of γ -radiation increases the survival rate of mice for 30 days after irradiation at the dose range of 3 – 9 Gy. On the model of immunosuppression induced by γ -radiation at a dose of 5 Gy, it was shown that ETE 9 promotes accelerated recovery of bone marrow, thymus and spleen morphology in comparison with spontaneous reconstitution. The structure of the medullary tissue assumes a physiological state on the 14th day of observation. It was discovered that under the influence of ETE 9, the absolute number of bone marrow cariocytes and the population composition of its lymphoid compartment were normalized already on day 14, thymocytes and cariocytes of the spleen – on the 21st day, what is ahead of the reconstitution of indices under the influence of the «Erbisol». The level of products of lipids peroxidation in bone marrow cells reaches physiological values on day 14, as opposed to the group receiving «Erbisol». The acceleration of the normalization of absolute number of the formed elements of blood, which occurs on the 14th day, ahead of the reconstitution of similar indicators in the comparison group, is also recorded. Normalization of the proportion of $CD3^+$, $CD4^+$, $CD8^+$ lymphocytes in groups using ETE 9 and «Erbisol» occurs simultaneously (at day 7), and the proportion of CD45R/B220-lymphocytes is on the 14th and 21st days, respectively. Under the influence of ETE 9, restoration of the functional activity of T and B-lymphocytes in animals with immunosuppression is achieved on average 7 days earlier than in the comparison group. The phagocytic index and the phagocytic number of neutrophils reached the physiological level in animals with immunosuppression for the effect of ETE 9 and «Erbisol» for the 14th day and 21st days respectively, both in both groups, while in the group of animals with spontaneous regeneration these rates were by 1,6 and 1,2 times lower than normal. A significantly higher and stable level of specific serogenesis in mice with immunosuppression after immunization with an antiviral vaccine «Inflexal V» under the ETE 9 administration was also recorded. It has been found that ETE 9 increases the level of G-CSF, IL-6 and reduces the level of Flt3-ligand to a greater extent than in the control group, with the normalization of their level on the 7th day. An increase in the serum levels of IL-1 β , IL-6 and IL-4 in mice is also recorded over the 1st day after the induction of radiation-induced immunosuppression. The use of ETE 9 stimulates the production of IL-1 β , IL-6 and IL-4 in mice during the first day after radiation induction, by 350 times and by 3 – 60 times, respectively, exceeding the effects of the use of the «Erbisol», with normalization on day 7 of the study, whereas under the action of «Erbisol» the normalization of the synthesis of all these cytokines is not observed until the end of the research period.

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