

УДК 579.871.1:234+8.097

ВПЛИВ ПРЕПАРАТУ DEL-IMMUNE V® НА ФУНКЦІОНАЛЬНУ АКТИВНІСТЬ ПРИРОДНИХ КЛІТИН КІЛЛЕРІВ ТА ПРОДУКЦІЮ ІМУНОРЕГУЛЯТОРНИХ ЦИТОКІНІВ

Н. О. Тимошок, Л. М. Шинкаренко, Л. М. Лазаренко, Ніколайчук В. І., Юрик О. М., М. Я. Співак

*Вплив препарату Del-Immune V® на функціональну активність природних клітин кіллерів та продукцію імунорегуляторних цитокінів. — Н. О. Тимошок, Л. М. Шинкаренко, Л. М. Лазаренко, Ніколайчук В. І., Юрик О. М., М. Я. Співак. — У статті наведено результати дослідження деяких імунологічних характеристик препаратів, Del-Immune V® якій являє собою сухий ферментативний лізат клітин штаму *Lactobacillus rannosus V*, та препарату Біфідим, що містить іmobilізовані біфідобактерії в поєднанні з аскорбіновою кислотою. Препарати виявили активність до продукції цитокінів імунної відповіді I типу (ІФН та ФНП), які здатні впливати цитотоксичну активність природних клітин кіллерів. Одержані результати дають підстави для розроблення наукового обґрунтування показань, доз і схем застосування пробіотичних препаратів.*

Адреса: Інститут мікробіології і вірусології ім. Д.К.Заболотного НАНУ

Вступ

Del-Immune V® імуномодулятор, якій являє собою сухий ферментативний лізат клітин штаму *Lactobacillus rannosus V*. Препарат зареєстровано у 2002 році U.S. Food and Drug Administration в якості харчової добавки для швидкої підтримки імунної системи під комерційною назвою **Del-Immune V® (United States Patent and Trademark Office, Reg.No. 3,023,625. Registered Dec.6, 2005)**. Препарат випускається компанією Pure Research Products, LLC (Boulder, Colorado, USA). Основною діючою речовиною Del-Immune V® є мурамоїлдипептиди (МДП) та ТТТСГТТТ мотиви фрагментів ДНК шт. *Lactobacillus rhamnosus GG*. Препарат виявляє широку противірусну (грипп, гепатит С) активність, ефективен при захворюваннях бактеріальної (бронхіт), грибкової природи, алергійних станах, фіброміагіях. Між тим, нез'ясовано механізм виявлення значної біологічної активності препарату. На сьогодні вже встановлено здатність клітин лактобактерій впливати на стан імунної системи та стимулювати захисні сили організму, продемонстрована їх можливість стимулювати утворення деяких цитокінів- інтерферонів, інтерлейкінів, впливати на біосинтез різних типів антитіл, відігравати роль ад'ювантів, виявляти протипухлинну дію [1; ii]. Лактобактерії містять гетерополімер пептидоглікан (30-70% від загальної клітинної маси) він складається з полісахаридних ланцюгів, що зв'язані поперечними короткими пептидами, які різняться між собою за складом і послідовністю розташованих в них амінокислот [iii]. Але імуномодулюючу дію пептидогліканів зв'язують саме з MurNac-L-Ala-D-Glu-NH₂ мурамоїлдипептидами, які виявляють множинну фармакологічну активність, здатність стимулювати

антиінфекційну резистентність, протипухлинний імунітет, виявляти ад'ювантні властивості, активувати імунокомпетентні клітини: макрофаги, Т- та В- лімфоцити, природні клітини кіллерів (ПКК), лімфокин-активовані кіллери (ЛІАК) та ряд інших клітин.

Так, МДП та нуклеїнові кислоти, що входять до складу Del-Immune V®, здатні впливати на відповідні рецептори імунної системи Toll-like receptors (TLR), через які відбувається активація імунокомпетентних клітин у тому числі і природних клітин кіллерів (ПКК). TLRs рецептори здатні впізнавати стимули бактеріального походження (певні мотиви) та активувати ряд генів, що супроводжується продукцією цитокінів, а також експресією на поверхні лейкоцитів сигнальних маркерів, рецепторів, інтегринів [iv].

У 1970 році ПКК були описані та названі неспецифічними лімфоцитами по їх здатності вбивати клітини пухлин та вірус інфіковані клітини без попередньої сенсibiliзації, проте в подальшому було показано, що ПКК мають цілу систему складних рецептор опосередкованих взаємодій, які дозволяють впізнавати клітини мішені. Так, на поверхні або в цитоплазмі ПКК, знайдені TLR 2, 3, 4, 5, 7 та 8, 9, які мають активуючий вплив на ці клітини. Було показано [v], що активація TLR ПКК відповідними лігандами призводить до продукції ІФН-γ та розвитку цитотоксичності по відношенню до клітин мішеней, але для виявлення цитотоксичності необхідна додаткова активація за рахунок імунокомпетентних клітин та продукції інших цитокінів, у тому числі ІФН-α та ІЛ-12.

Саме грампозитивні бактерії в тому числі лакто- і біфідо- бактерії активують головний ком-

плексе гістосумісності II класу, що супроводжується індукцією ІФН- γ та ІЛ-12, які необхідні для диференціювання Т-хелперів у напрямленні Th1 субпопуляції. Показано, що для *Lactobacillus plantarum* [vi], *Leuconostoc mesenteroides ssp. cremoris*, *Streptococcus thermophilus* продукція ІЛ-12, моноцитами, строго корелює з про запальними цитокінами ІФН- γ , ФНП- α [vii]. Відомо, що ІФН- γ інгібує проліферацію Th2, але не Th1, що веде до підсилення ефекторних функцій Т-лімфоцитів, цитотоксичної активності ПКК та макрофагів й розвитку імунної відповіді за клітинним типом, що відіграє вирішальну роль в елімінації клітин пухлин, вірус інфікованих клітин та клітин інфікованих внутріклітинними бактерійними патогенами. [viii]. Встановлена участь ПКК в регуляції гемопоезу, так ПКК мають здатність продукувати різні цитокіни в тому числі гемопоетичні фактори: ІЛ-3, гранулоцитарно-макрофагальний колонієстимулюючий фактор, ФНП- α , ІФН- β , ІФН- γ , трансформуючий фактор росту В та ІЛ-21. [ix]. Здатність до продукції імунорегуляторних цитокінів наводить на думку, що ПКК можуть само регулювати свій цитотоксичний потенціал, та впливати на перебіг того, чи іншого захворювання.

На моделі стафілококової інфекції у мишей встановлено, що активація системи інтерферону під впливом синтетичних мурамоїлдипептидів призводить до підвищення неспецифічної резистентності організму та функціональної активності ПКК і є ключовим моментом в сприятливому перебігу інфекційного процесу [x]. Так, синтетичні та природні МДП мають ад'ювантну дію, здатність стимулювати неспецифічну антиінфекційну резистентність, протипухлинний імунітет, активувати імунокомпетентні клітини, підсилувати цитотоксичну активність ПКК та індукувати ряд цитокінів.

Для живих культур лактобактерій *Lactobacillus bulgaricus*, *L. acidophilus*, *L. casey* та інших показано, що дані культури в системі *in vitro* підсилювали як цитотоксичність ПКК так і здатність лімфоцитів периферійної крові до продукції ІФН- γ [xi]. Під впливом живих культур *Lactobacillus GG* в системі *in vitro* мононуклеари крові продукували цитокіни імунної відповіді I-го типу, які пригнічували синтез ІЛ4. [xii]

Проте, інші дані свідчать, що імуномодулююча та протипухлинна активність *Lactobacillus bulgaricus* опосередкована не тільки наявністю живих клітин, але і активацією імунокомпетентних клітин під впливом глікопептидів та МДП клітинної стінки. [xiii]. Це пов'язано з модулюючою активністю стимулів бактеріального походження у тому числі і МДП та їх синтетичних аналогів на продукцію цитокінів [xiv]. На сьогодні уявлення щодо клітинної кооперації медіаторів, а саме цитокінів як регуляторів імунітету, значно поглиблені. Слід зауважити, що цитокіни не мають строго специфічної дії на окремі імунокомпетентні

клітини. Тобто імуномодулюючий препарат може мати вибіркву дію на відповідний компонент імунітету, але кінцевий ефект його впливу на імунну систему завжди буде багатограним.

В зв'язку з цим актуальним завданням сучасної імунобіотехнології є пошук та вивчення нових імуномодуляторів на основі лакто- та біфідобактерій використання яких давало би мінімум побічних ефектів, стимулювало би не тільки імунні реакції, але і збалансованість імунної системи та підсилювало її адаптаційні можливості.

Саме тому мета роботи полягала в дослідженні модулюючого впливу препарату Del-Immune V®, що містить фрагменти ДНК та пептидоглікану штаму *Lactobacillus ramosus V* на цитотоксичну активність природних клітин кіллерів та продукцію імунорегуляторних цитокінів *in vitro* та *in vivo*.

Матеріал та методи

Вплив Del-Immune V® на імунологічні реакції організму досліджували на мишах СВА вагою 14-16 г. Тварини, підібрані за принципом аналогів були поділені на 5 груп по 15 голів у кожній. Мишам першої, другої та третьої груп на протязі 3 діб з інтервалом у 24 години вводили перорально за допомогою игли з наплавленою оливою по 0,5 мл водного розчину Del-Immune V® в дозах відповідно групам (5, 50, 500 мкг/мишу). Мишам четвертої дослідної групи вводили на протязі 3 діб перорально по 0,5 мл водної суміші препарату Біфідим - контрольний пробіотичний препарат, що містить суху масу антагоністичних біфідобактерій в поєднанні з аскорбіновою кислотою імобілізованою на ентеросорбенті, в дозі 50 мкг/мишу. Мишам п'ятої контрольної групи вводили по 0,5 мл фізіологічного розчину. Продукцію інтерферону (ІФН) визначали у інтактних та дослідних мишей через 8, 24, 72 години після початку введення препаратів. Для цього одержували сироватку крові, селезінку тварин.

Для підбору оптимальної дози, часу інкубування дослідження імуномодулюючої дії та індукції імунорегуляторних цитокінів в спленоцитах та МФПС -1×10^7 кл/мл дослідних та інтактних мишей використовували препарати Del-Immune V® та Біфідим в кінцевих концентраціях 5, 10, 50 мкг/мл та стандартні індуктори ІФН - Poly I- poly C у концентрації 10 мкг/мл, ФГА або ЛПС - 20 мкг/мл після інкубації клітин з препаратами у культуральному середовищі визначали рівень продукованих цитокінів. Активність сироваткового та індукованого ІФН- α та γ визначали за стандартною методикою мікротитрування у перевивній культурі клітин L-929, проти 100 ТЦД 50 вірусу-індикатора (ВВС, вірус везикулярного стоматиту шт. Індіана) в умовах постійного рівня CO₂. Клітини селезінки отримували за загальноприйнятою методикою, описаною [xv].

Тестування цитолітичної активності ПКК проводили колориметричним методом у 18 годинному

тесті мікроцитотоксичності використовуючи спленоцити без еритроцитів у концентрації 5×10^7 кл/мл проти мішеней L₉₂₉ (5×10^5 кл/мл) [xvi].

Активність ФНП оцінювали за цитотоксичною дією на перевивні культури фібробластів миші L-929 [xvii].

Усі досліди проводили не менше ніж в трьох повторах з використанням відповідних контролів. Цифрові дані, отримані в результаті досліджень, оброблялися статистичними методами з використанням t-критерію Ст'юдента [xviii]. Різницю вважали достовірною при значенні $P < 0,05$ [xix].

Результати

Суттєве накопичення інтерферону у сироватці крові під впливом щоденного перорального введення Del-Immune V® або Біфідим спостерігалось вже через 24 год. Так, на фоні введення Del-Immune V® або Біфідим в дозі 50 мкг/мл титри ІФН підвищувались з $(2,0 \pm 0,3) \log_2$ од/мл у контролі відповідно до $(4,2 \pm 0,5)$ та $(3,8 \pm 0,4) \log_2$ од/мл ($P < 0,05$). При повторному введенні препаратів на 48 год. спостереження рівні циркулюючого ІФН досягали відповідно $(5 \pm 0,2)$ та $(4,4 \pm 0,3) \log_2$ од/мл ($P < 0,05$) проти $(2,0 \pm 0,3) \log_2$ од/мл у контролі. Подальше введення Del-Immune V® в дозі 50 мкг/мл на 3 добу дозволяло підтримувати досягнутий рівень $(4,8 \pm 0,5) \log_2$ од/мл. Введення препарату на 4 добу призводило до зниження рівня циркулюючого ІФН до $(3,8 \pm 1,2) \log_2$ од/мл, с послідуєчим підвищенням рівня ІФН у циркуляції до $4,3 \log_2$ од/мл на 5 добу після першого введення індуктору. Аналогічні закономірності продукції ІФН виявлені при введенні Del-Immune V® в дозах 5 и 500 мкг/мл. Рис.1

Пероральне введення препарату Біфідим щодоби у дозі 50 мкг/мишу, також призводило до підвищення рівня циркулюючого ІФН. Максимальний рівень циркулюючого ІФН $(5 \pm 0,2) \log_2$ од/мл спостерігали на 2 добу після введення препарату.

Подальше введення Біфідим не призводило до підвищення рівня ІФН у циркуляції, досягнутий рівень підтримувався на протязі 3-4 діб, повертаючись до вихідного на 5 добу.

Тобто динаміка накопичення ІФН у сироватці крові мишей, що одержали Del-Immune V® або Біфідим була подібною. Слід зауважити, що Del-Immune V® містить структурні компоненти *Lactobacillus ramosus V*, а Біфідим живу культуру біфідобактерій.

При пероральному однократному введенні препарату Del-Immune V® в дозі 50 мкг/мишу титр ІФН в сироватці крові досягає максимальних значень $(4,4 \pm 0,3) \log_2$ од/мл через 24 год. Відповідь організму на введення Del-Immune V® характеризується пролонгованим інтерфероногенним ефектом до 2 діб.

Пероральне введення препаратів Del-Immune V® та Біфідим призводило до утворення ендеген-

ного ФНП. ФНП – це цитокін, який є посередником під час передавання сигналів від однієї клітини до іншої, а також відіграє значну роль у ефекторній та регуляторній ланці імунної реактивності організму. Відомі два види ФНП: ФНП- α (кахектин) та ФНП- β (лімфотоксин), які мають гомологію 28% на амінокислотному рівні. Відомо, що ФНП- α продукується макрофагами/моноцитами, проте джерелом ФНП- β є мітоген стимульовані В- і Т-клітини [xx]. Крім цього, ФНП має протипухлинну дію, відіграє важливу роль при бактеріальних інфекціях, кілінгі патогенів та прозапальних реакціях організму, виявляє плейотропні біологічні ефекти. Каскад індукційних сигналів, початий ФНП, веде до послідовної продукції ІЛ-1, активації Т-лімфоцитів, продукції ІЛ-2 та генерації популяції, протипухлинних ефекторних клітин – лімфокін активованих кілерів, які здатні викликати лізис пухлинних клітин. Протівірусна дія ФНП полягає в стимуляції β_1 і β_2 –інтерферонів та селективної цитотоксичної дії на клітини-мішені інфіковані ДНК- та РНК-вірусами [xxi]. ФНП- α взаємодіє з мембранним рецептором Fas (CD95), який широко представлений на нейтрофілах – ефекторних клітинах антиінфекційного нагляду організму та інших клітинах організму за виключенням еритроцитів та неактивованих лімфоцитів [xxii].

Під впливом щоденного перорального введення препаратів Del-Immune V® та Біфідим у дозі 50 мкг/мишу концентрація циркулюючого ФНП підвищувалась з $0,3$ нг/мл у контролі, відповідно до $0,6$ та $0,7$ нг/мл ($P < 0,05$) (Рис.2).

Найбільш високі рівні циркулюючого ФНП під впливом дослідних препаратів відмічали на 8 годину, з послідуєчим зниженням рівня у циркуляції на 24 годину досліду. Рівень ФНП у сироватці крові повністю зникав з циркуляції на 72 годину спостереження.

Препарат Біфідим, що містить живі біфідобактерії, в дозі 50 мкг/мл викликає досить значну стимуляцію ФНП до $0,8$ нг/мл ($P < 0,05$) проти $0,3$ нг/мл у контролі. Препарат Del-Immune V® в дозах 5 та 500 мкг/мишу також викликав стимуляцію ФНП, так індекс цитотоксичності у сироватці крові досягав відповідно $0,4$ нг/мл ($P > 0,05$) та $0,8$ нг/мл ($P < 0,05$) проти $0,3$ нг/мл у контролі. Встановлена циркуляція ендегенного ФНП у системі *in vivo*, потребує додаткового дослідження, оскільки в літературі є повідомлення, що рівень продукції ФНП у відповідь на стимуляцію макроорганізму залежить від його імунореактивності.

Відомо, що підвищена продукція ФНП призводить до активації нейтрофілів, макрофагів, лімфоцитів, що підсилює противоінфекційний імунітет. Тобто препарати Del-Immune V® та Біфідим здатні при пероральному введенні в організм активувати Т-хелпери першого типу (Th1) с фенотипом CD4⁺, викликати синтез прозапальних цитокінів ІФН та ФНП, які сприяють, в основному, розвитку клітинної імунної відповіді та беруть участь в роз-

виту антибактеріальної і протипухлинної імунної відповіді, активації радіопротекторних властивостей організму.

Паралельно в системі *in vitro* визначали здатність даних препаратів до індукції імунорегуляторних цитокінів. Показано, що Del-Immune V® та Біфідим при культивуванні як з культурами спленоцитів так і макрофагів вже на 1 добу досліду викликали синтез ІФН та ФНП. Продукція цитокінів у культуральному середовищі при інкубуванні з препаратами за часом не співпадала. Значне накопичення ІФН у супернатантах спленоцитів миші при культивуванні з препаратами спостерігали на 48 год досліду. Так, Del-Immune V® в дозі 50 мкг/мл при внесенні в культуру спленоцитів мишей, що отримали цей препарат, індукував до $\log_2 5,2$ од/мл. Зниження кінцевої концентрації препарату Del-Immune V® до 5 та 10 мкг/мл при спільному культивуванні з с спленоцитами не призводило до підвищення рівня ІФН у супернатантах, титри ІФН склали відповідно $\log_2 3$ од/мл та $\log_2 3,5$ од/мл проти $\log_2 2$ од/мл у контролі (Рис.3).

Культивування спленоцитів мишей, що отримали дослідні препарати з індукторами Poly I-Poly C та ФГА викликало 2-3 кратне підвищення інтерференової відповіді α та γ ІФН порівняно з клітинами інтактних мишей. Здатність до підвищеної продукції α -ІФН і γ -ІФН під впливом відповідних індукторів ІФН спостерігали у спленоцитів як через 8, так і через 24 та 72 години після введення дослідних препаратів.

Паралельно у отриманих супернатантах спленоцитів дослідних та інтактних мишей при спільному культивуванні з препаратами визначали і ФНП. (Рис.4)

Рівні індукваного ФНП під впливом препаратів в культурі спленоцитів дослідних мишей були вищі порівняно з відповідними рівнями ФНП одержаними з культур спленоцитів інтактних мишей.

Клітини, які обробляли ЛПС, індукували досить високі рівні ФНП до 1,2 нг/мл. Слід відміти, що ЛПС *Escherichia Coli* O55:B5 (Sigma) є стандартним індуктором ФНП. Можливо не висока продукція ФНП у культурі спленоцитів пов'язана з біологічною особливістю лімфоїдних клітин, оскільки найбільш активними продуцентами ФНП є макрофагальні клітини.

Слід зазначити, що індукуюча спроможність клітин до продукції ФНП залежала від дози дослідних препаратів. Крім цього, проводили ЛПС – індуквану продукцію ФНП спленоцитами дослідних тварин показано, що у відповідь на специфічний індуктор фактору некрозу пухлин ЛПС, такі клітини більш інтенсивно продукували ФНП, порівняно з інтактними тваринами.

Тобто спленоцити миші під впливом препаратів продукували імунорегуляторні цитокіни ІФН та ФНП, які мають безпосередній вплив на природу цитотоксичність ПК-клітин.

Саме тому, наступним завданням було дослідження впливу препаратів Del-Immune V® та Біфідим на активність ПКК в системі *in vitro*.

Відомо, що ПКК відіграють важливу роль в імунологічному нагляді організму. Вони є поліфункціональною ланкою системи імунітету, від ефективності якої залежить як специфічна так і неспецифічна резистентність організму [xxiii]. Популяція ПКК гетерогенна по антигенним маркерам і функціональній активності субпопуляції лімфоцитів [xxiv] та на рівні ПКК про інтегровані майже усі функції, які притаманні імунній системі. Встановлено, що при перебігу багатьох патологічних процесів в організмі існує пряма кореляція між зміною активності ПКК та здатністю лімфоцитів синтезувати ІФН. Виражений модулюючий вплив ІФН на функцію ПКК дає змогу розглядати його як основний фактор фізіологічної регуляції активності даної популяції ефекторних клітин [xxv]. Цитотоксичність ПКК в умовах *in vitro* та *in vivo* підсилюють різні типи інтерферону (α/β та γ -ІФН) [xxvi].

Слід зазначити, що оброблені Del-Immune V® та Біфідим спленоцити продукують ІФН, який значно потенціює цитолітичну дію ПКК. Індукований ІФН прискорює цитолітичну дію ПКК, швидко конвертує пре-ПКК в ПКК, пре ПКК здатні приєднуватись до мембрани клітин, але не здатні викликати їх лізис. Стимульований ІФН активує цитотоксичну здатність ПКК та захищає нормальні клітини від можливої цитотоксичної дії ПКК.

Саме тому необхідно дослідити вплив Del-Immune V® на функціональну активність ПКК в порівнянні з дослідженням інтерферогенних властивостей препарату Del-Immune V®.

На фоні щоденного введення Del-Immune V® підвищений рівень циркулюючого ІФН корелював з підвищеною цитотоксичною активністю ПКК. Проте, на першу добу досліду активність ПКК під впливом препарату Del-Immune V® підвищувалася не достеменно, у мишей, що одержали препарат в дозах 5,50,500 мкг/мишу індекс цитотоксичності складав відповідно (33%; 57%, 42%) в той час як у мишей, що не одержали препарат (контроль), цей показник складав 30,4%. На другу добу досліду високій рівень циркулюючого ІФН у дослідних мишей при повторному введенні Del-Immune V® в дозі 50 мкг/мишу поєднувався з максимальною цитотоксичною активністю ПКК (Рис.5).

Так, на II добу індекс цитотоксичності (ІЦ) досягав 62,0% ($P < 0,05$), в той же час як у мишей, що не отримали препарат (контроль) даний показник складав 30,4%. Підвищення дози препарату Del-Immune V® до 500 мкг/мишу не призводило до зростання ІЦ порівняно з дозою 50 мкг/мишу, але порівняно з контролем ІЦ ПКК складав – 39,5% ($P < 0,05$) проти 30,41%. Навіть зниження дози препарату Del-Immune V® до 5 мкг/мишу також викликало підвищення функціональної активності ПКК до 35,0 ($P < 0,05$) порівняно з 30,41% у конт-

ролі. Введення препарату Біфідим у дозі 50 мкг/мишу дозволяло підвищити цитотоксичну активність ПКК, так ІЦ досягав 41,58% ($P < 0,05$) проти 30,41% у контролі.

Встановлено, ПКК клітини проявляють імунорегуляторну роль, оскільки вони здатні продукувати лімфокіни: α -ІФН, γ -ІФН, ІЛ-1, ІЛ-2, фактори росту В – клітин. Показано, що окрім власної здатності до продукції імунорегуляторних цитокінів ПКК можуть активуватись і опосередкованим шляхом, через систему медіаторів, так стимуляція імункомпетентних клітин під впливом препаратів бактеріального походження призводить до продукції ІФН, який є ключовим фактором дозрівання та саморегуляції ПКК.

Слід зазначити, що в механізмі активуючого впливу γ -ІФН та ФНП на ПКК важливе значення має індукція експресії на поверхні мембрани ПКК рецепторів до ІЛ-2, який значно потенціює цитолітичну дію ПКК [xxxvii]. В свою чергу для того щоб ПКК почали продукувати ІФН- γ кілерам потрібний вплив інших цитокінів в тому числі ІЛ-2 та ІЛ-12, тобто відбувається не пряма активація ефекторних функцій ПКК. Відомо, що ІЛ-2 підсилює активність ПКК, інгібує продукцію простагландину Е, антагоністу ІФН. Підсилення продукції ІФН- γ власно ПК- клітинами під впливом ІЛ-2 та ІЛ-12 програмує диференціювання ПКК з стадії попередників ПКК у стадії пре - ПК клітини. Цитотоксична активність ПКК може бути підсилена рядом цитокінів ІЛ-2, ІФН (α , β , та γ), ФНП, ІЛ-12, and ІЛ-15 [xxxviii, xxxix, xxx].

Пряме впізнання клітини-мішені або патогену відбувається ПК-клітиною за рахунок цілої системи рецепторів.

Існує уявлення, що утворення кон'югатів між ПКК та їх мішенями (L-929, K-562 и др.) відбувається за участю лектинподібних структур та їх лі-

гандів на поверхні взаємодіючих клітин. Так, лектини можуть виступати як регулятори у системі ліганд рецепторної взаємодії. Існують повідомлення об експресії на кілерних клітинах людини та миші поверхневих вуглеводних детермінант, що специфічно зв'язуються з лектинами [xxxxi, xxxxii]. За даними [31], на поверхні кілерних клітин нет α -фукози, d-галактоза екранована залишками сіалових кислот, проте виявляється наявність N-ацетіл-D-глюкозаміна та d-маннози. Крім цього, на поверхні ПКК знайдені кілерні імунoglobulin-подібні рецептори (KIP). Саме KIP рецептори зв'язуються з певними класичними молекулами гістосумісності класу 1, що є на поверхні здорових клітин, такі рецептори мають імунотирозин-інгібуючий мотив у цитоплазматичному хвості та здатні до інгібіції активності ПКК та захисті здорових клітин від лізису. [xxxiii].

Важлива функція ПКК полягає в елімінації клітин-мішеней, на поверхні котрих відсутні або змінені маркери, характерні для здорових клітин організму. Для попередження небажаної загибелі клітин на поверхні нормальної антологічної клітини існує відповідний рецептор, який здатний відправити ПКК клітинам інгібаторний сигнал. Найбільш повно охарактеризовані інгібаторні сигнали, які представляються ПКК молекулами гістосумісності I класу (HLA I класу) [xxxiv, xxxv]. Відомо, що HLA I класу експресуються всіма ядерними клітинами та в фізіологічних умовах підтримують толерантність ПКК к власним тканям, тобто цитотоксичність ПКК підсилюється саме до антиген змінених клітин. При деяких патологічних умовах, наприклад, при вірусній інфекції або при пухлинних процесах порушується експресія молекул HLA I класу, при таких умовах дана система не може підтримувати звичайну толерантність ПКК.

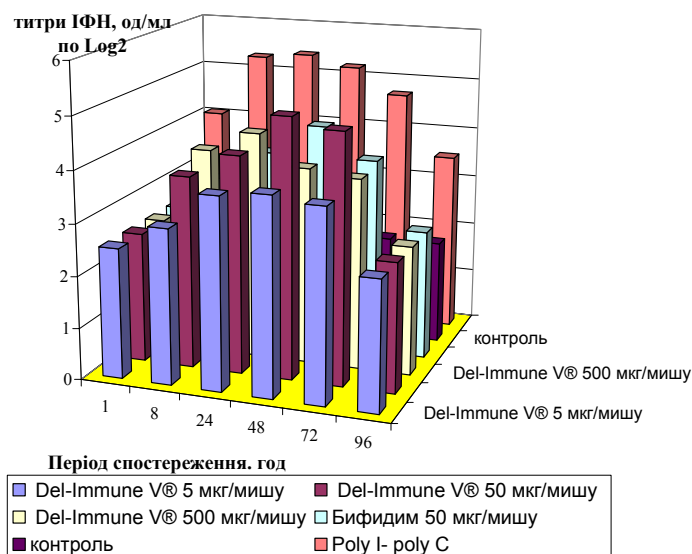


Рис. 1. Динаміка накопичення ІФН у сироватці крові мишей при пероральному введенні Del-Immune V® або Біфідим

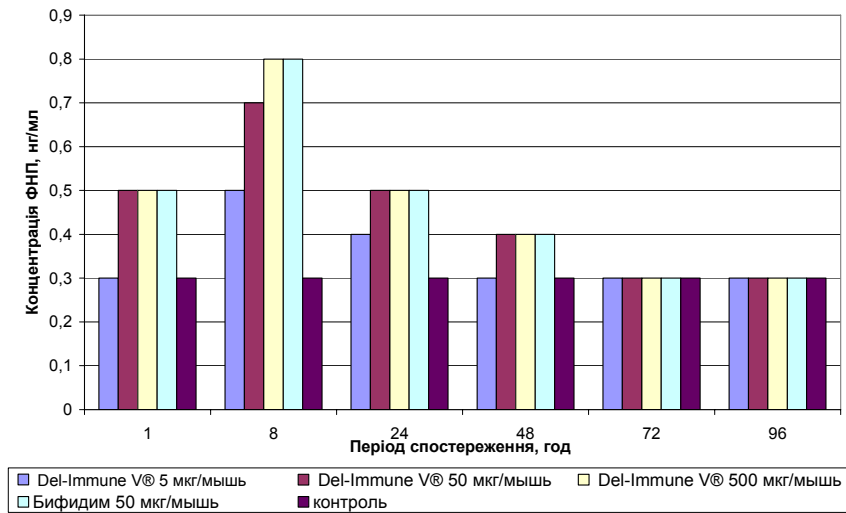


Рис.2. Динаміка накопичення ФНП у сироватках крові мишей під впливом препаратів Del-Immune V® та Біфідим

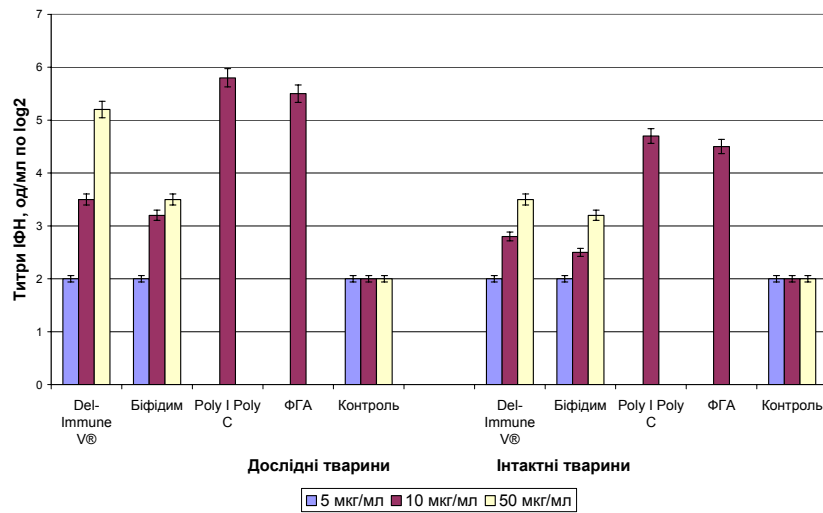


Рис.3. Продукція ІФН під дією різних концентрацій Del-Immune V® та Біфідим в культурі спленоцитів інтактних та дослідних мишей

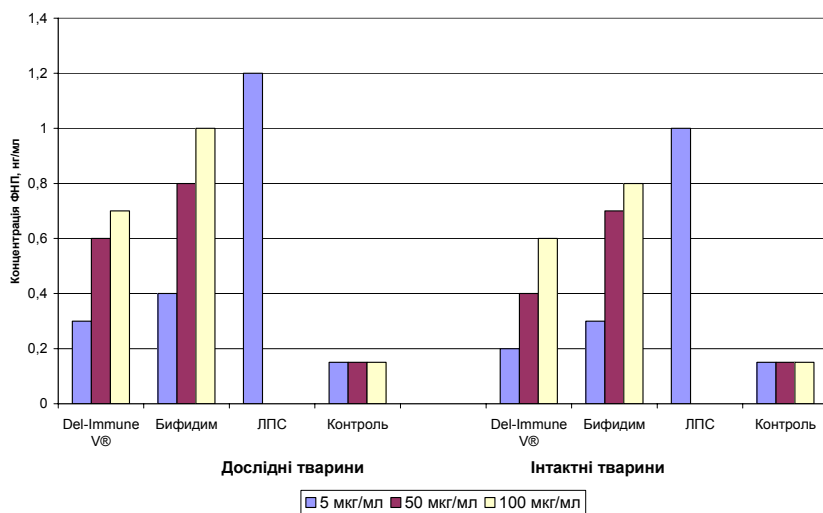


Рис. 4. Продукція ФНП під дією різних концентрацій Del-Immune V® та Біфідим в культурі спленоцитів інтактних та дослідних мишей

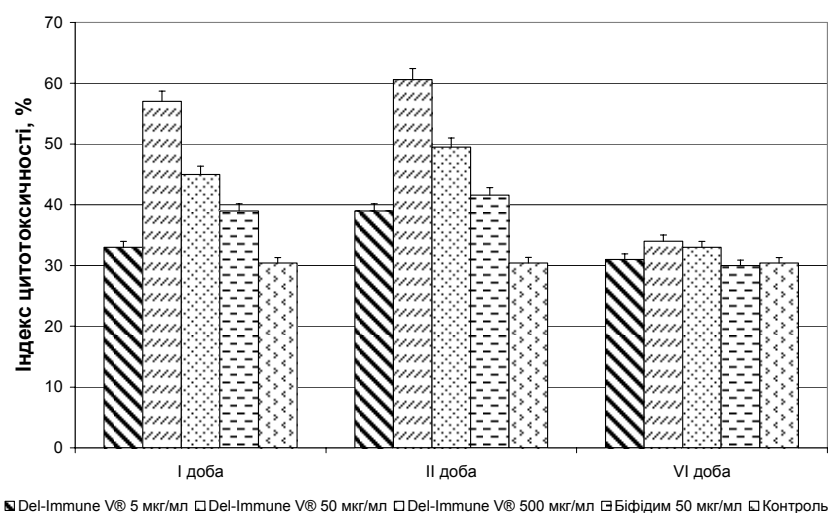


Рис. 5. Активність ПКК у мишей, що одержали препарати Del-Immune V® та Біфідим

Табл.1. Вплив Del-Immune V® та Біфідим на активність ПКК в системі *in vitro*

Контроль	Індекс цитотоксичності %									
	Del-Immune V® мкг/мл				Біфідим мкг/мл					
	50	25	12,5	6,25	3,12	1,5	0,7	50	25	12,5
31,6	64,4	70,4	61,1	41,3	39,7	35,2	32,0	48,6	52,0	36,7

Під впливом патологічного процесу ПКК активуються, підсилюються цитотоксичність, а також продукція цитокінів, і це є компонентом ранньої імунної відповіді по відношенню до вірус-індукованих або пухлинних клітин. На моделі з вірусними і бактеріальними збудниками було показано, що продукція ІФН- γ ПК-клітинами є ключовим моментом для сприятливого перебігу інфекції.

Проте в системі *in vitro* спостерігається інша картина, так внесення препарату Del-Immune V® в систему тестування значно підвищувало цитотоксичну активність ПКК. Аналогічні результати були одержані при внесенні в тест-систему Біфідим. Табл.1.

При дослідженні впливу препарату Del-Immune V® на активність ПКК в системі *in vitro* показано, що препарат в дозі 25 мкг/мл при додаванні в систему тестування, вже в перші 24 години інкубування виявляв стимулюючу дію на ПКК, так ІЦ досягав 70,4% ($P > 0,05$) проти 31,6% у контролі.

Del-Immune V®, виявляє інтерферогенну активність, активує ПКК по інтерферон залежному механізму, оскільки відомо, що ІФН впливає на ПКК та Т-лімфоцити, підсилює їх проліферацію та експресію маркерів, відповідальних за цитотоксичну активність. ІФН- γ активує макрофаги, через відповідні рецептори для цього медіатора та приймає макрофаги для неспецифічного лізису пухлинних клітин шляхом підвищення експресії на клітині – мішені Ia - та DR-антигенів. Для виявлення цитотоксичної активності макрофагів, окрім ІФН, необхідний інший стимулюючий сигнал (ФНП). Відомо, що ІФН- γ та ФНП – мають синергидну дію. Так, макрофаги під впливом ІФН- γ та ФНП не тільки

виявляють фагоцитарну активність але і здатність взаємодіяти з Т- та В – лімфоцитами, які формують імунну відповідь. Для активації ефекторної функції макрофагів необхідні 2 сигнали. На першому етапі ІФН- γ здійснює праймінг - ефект макрофагів та готує їх для прийняття другого сигналу, який може бути здійснений різними цитокінами у тому числі і ФНП.

Таким чином, дослідження впливу Del-Immune V® на продукцію імунорегуляторних цитокінів інтерферону та фактору некрозу пухлин *in vitro* та *in vivo*, а також на цитотоксичну активність ПКК показало, що дані культури є потенційними індукторами цитокінів імунної відповіді I типу (ІФН та ФНП), які здатні впливати цитотоксичну активність ПКК. Це дає підстави для розроблення наукового обґрунтування показань, доз і схем застосування про біотичних препаратів як для підвищення стійкості організму до інфекцій, оздоровлення імунної системи при тимчасових вторинних імунодефіцитах, так і для лікування різних захворювань, причому вони стимулюють пригнічену імунну систему і не впливають на імунну систему в нормальному стані. Препарати, що виготовляються на основі лакто- та біфідобактерій, не мають протипоказань, мають низьку токсичність, їх дія є фізіологічною, тож вони вже зараз можуть широко використовуватися для корекції мікробіоти та імунних порушень. Універсальність та швидкість дії таких препаратів, висока ефективність, а також доступність їх отримання дозволяють розраховувати на перспективність цього напрямлення досліджень з метою профілактики інфекційних захворювань, які супроводжуються виникненням імунодефіцитного стану.

- ⁱ H. Yasui, K. Shida, T. Matsuzaki, T. Yokokura Immunomodulatory function of lactic acid bacteria J. Antonie van Leeuwenhoek Volume 76, Numbers 1-4 / November, 1999 ; Simin Nikbin Meydani and Woel-Kyu Ha Immunologic effects of yogurt American Journal of Clinical Nutrition, Vol. 71, No. 4, 861-872, April 2000
- ⁱⁱ Corthésy B., Gaskins H. Rex, Mercenier A. Supplement: Effects of Probiotics and Prebiotics Cross-Talk between Probiotic Bacteria and the Host Immune System // J. Nutr. 137:781S-790S, March 2007
- ⁱⁱⁱ Shleifer K.-H., Kandler O. Peptidoglycan types of bacterial cell walls and their taxonomic implications // Bacteriol. Revs. – 1972. – V.36. – № 4. – P. 407-477
- ^{iv} Underhill, D. M., and A. Ozinsky. 2002. Toll-like receptors: key mediators of microbe detection. Curr. Opin. Immunol. 14:103-110.
- ^v Arase, H., Arase, N., Saito, T., 1996. Interferon γ production by natural killer cells and NK1.1⁺ T cells upon NKR-P1 cross linking. J. Exp. Med. 183, 2391-2396.; Kozlowski M, Schorey J, Portis T, Grigoriev V, Kornbluth J. 1999 NK lytic-associated molecule: a novel gene selectively expressed in cells with cytolytic function. // J Immunol Aug 15;163(4):1775-85.
- ^{vi} S.van Hemert, M. Meijerink, D. Moneaar et al. Immunomodulation by different strains of Lactobacillus Plantarum // Proceedings Ninth symposium on lactic acid bacteria D 024.
- ^{vii} Probiotic *Leuconostoc mesenteroides ssp. cremoris* and *Streptococcus thermophilus* induce IL-12 and IFN – γ production // World Gastroenterol 2008, N 28; 14(8) P. 1192-1203
- ^{viii} Ghiringhelli F, Menard C, Martin F, Zitvogel L. The role of regulatory T cells in the control of natural killer cells: relevance during tumor progression // Immunol Rev. 2006 Dec;214:229-38
- ^{ix} Coquet JM, Kyriassoudis K, Pellicci DG, Besra G, Berzins SP, Smyth MJ, Godfrey DI. IL-21 Is Produced by NKT Cells and Modulates NKT Cell Activation and Cytokine Production. J Immunol. 2007 Mar 1;178(5):2827-34.
- ^x Грабченко Н.І. Протеktivна дія бактеріальних глікополімерів при стафілококової інфекції // Автореф.дис...канд.біол.наук.-Київ., 1998.-20с.
- ^{xi} Цой И.Г., Сапаров А.С., Тимофеев И.К. и др. Иммуностимулирующее действие лактобактерий на цитотоксичность естественных клеток-киллеров и продукцию интерферона // Журн. Микробиол.-1994.- №6.-С.112-113.
- ^{xii} Lammers K.M., Brigidi P., Vitali V. et.al. Immunomodulatory effects of probiotic bacteria DNA: IL-1 and IL-10 response in human peripheral blood mononuclear cells. FEMS immunol. Med. Microbiol. 2003; 38(2), p.165-172.
- ^{xiii} Драннік Г.М., Мосієнко В.С. Бластен – стимулятор продукції інтерлейкіну-1 у хворих на хронічний обструктивний бронхіт. // Галиць. лік. Вісн. –1998. -№ 5(3). –с.34-42.
- ^{xiv} Мосієнко В. С., Мосієнко М. Д., Савцова З. Д., Даниленко В. С., Волкова М. Ю., Шинкаренко Л. М., Щеглова Н. А., Восп'яков В. Г., Свідро О. В., Меньок Т. А. Бластен - новый отечественный иммуномодулятор биологического происхождения // Журн. АМН України, 1999, т. 5, №1. - С. 79-86
- ^{xv} Лимфоциты. Методы / Под ред. Дж. Клауса. - М.: Мир, 1990. - С.39-69.]
- ^{xvi} Кузовкова Н.А. Оценка активности естественных киллеров колометрическим методом // Иммунология.-1991.-№4.-С.59-61.
- ^{xvii} Meager A., Leung H., Waley J. Tumor necrosis factor alpha (TNF) // J. Immunol. Meth.-1989.-V.116,N1.-P.1-17.
- ^{xviii} Бейли Н. Статистические методы в биологии.- М.: Изд-во иностранной литературы, 1962.-260с.
- ^{xix} Гублер Е.В. Вычислительные методы анализа и распознавания патологических процессов. — М.: Медицина, 1978. — 294 с.
- ^{xx} Chroboczek-Kelker H., Oppenheim J., Stone-Wolff D, Henriksen-DeStefano D, Aggarwal BB, Stevenson HC, Vilcek J. 1985 Characterization of human tumor necrosis factor produced by peripheral blood monocytes and its separation from lymphotoxin // Int.J. Cancer. - Vol. 36, N1.- P.69-73
- ^{xxi} Ваядро М.М., Навашин С.М. Цитокины – полифункциональные регуляторы защитных реакций в норме и при патологии // Антибиотики и химиотерапия 1989, т 34, № 11 , стр 863.
- ^{xxii} Зубова С.Г., Окулов В.Б. Молекулярные механизмы действия фактора некроза опухолей α и трансформирующего фактора роста I в процессе ответа макрофага на активацию // Иммунология.- 2001. №5.- С.18-22.
- ^{xxiii} Семененя И.Н. Естественные киллерные клетки (ЕКК) как звено в иммунной системе организма // Иммунология.-1991.-N 4.- С. 4-6.
- ^{xxiv} Ломакин М.С. Иммунобиологический надзор. – М., 1990
- ^{xxv} Taylor J.L., Sabran J.L., Grossberg S.E. The cellular effects of interferon. / In: Interferon and their applications, Ed. Came P.E. and Carter W.A., Springer-Verlag, - 1984 - P.169-204.
- ^{xxvi} Спивак Н.Я. Антибактериальная эффективность препаратов интерферона и его индукторов в различных биологических системах: Автореф. Дис...докт.биол.наук: 03.00.07. 14.00.36. - Киев.,1987.-45с.
- ^{xxvii} Chouib S. // Lymphokine receptor Interaction.- Paris, London, 1909.- P.33-41.
- ^{xxviii} Kuribayashi, K., S. Gillis, D. E. Kern, C. S. Henney. 1981. Murine NK cell cultures: effects of interleukin-2 and interferon on cell growth and cytotoxic reactivity. //J. Immunol. 126:2321.; Trinchieri, G., M. Matsumoto-Kobayashi, S. C. Clark, J. Seehra, L. London, B. Perussia. 1984. Response of resting human peripheral blood natural killer cells to interleukin 2. //J. Exp. Med. 160:1147.
- ^{xxix} Carson, W. E., J. G. Giri, M. J. Lindemann, M. L. Linett, M. Ahdieh, R. Paxton, D. Anderson, J. Eisenmann, K. Grabstein, M. A. Caligiuri. 1994. Interleukin (IL) 15 is a novel cytokine that activates human natural killer cells via components of the IL-2 receptor. // J. Exp. Med. 180:1395.
- ^{xxx} Kozlowski M, Schorey J, Portis T, Grigoriev V, Kornbluth J. 1999 NK lytic-associated molecule: a novel gene selectively expressed in cells with cytolytic function. //J Immunol Aug 15;163(4):1775-85.
- ^{xxxi} Frydeska T., Slesak B., Benezur M, Harlozinska-Szymrka A Heterogeneity of human natural killer cells with respect to lectin-binding ability. // J. nat. Cancer Inst.—1987.—Vol. 78, N 6.—P. 1145-1148.; Saron M. F., Truffa B. P., Guillan J. C Rapid enrichment of mouse natural killer cells by use of wheat germ agglutinin // J. immunol. Meth.— 1983.— Vol. 59, N 2,— P. 151 — 158.
- ^{xxxii} Vose B. M., Blackledge G., Crowther D Lectin-binding characteristics of human natural killer cells. // Immunology.— 1982.— Vol. 46.—P. 616—624.
- ^{xxxiii} Kwakkel-van Erp JM, van de Graaf EA, Paantjens AW, van Ginkel WG, Schellekens J, van Kessel DA, van den Bosch JM, Otten HG. The killer immunoglobulin-like receptor (KIR) group A haplotype is associated with bronchiolitis obliterans syndrome after lung transplantation. J Heart Lung Transplant. 2008 Sep;27(9):995-1001.
- ^{xxxiv} Herberman RB, Hiserodt J, Vujanovic N, et al. Lymphokine-activated killer cell activity: characteristics of effector cells and their progenitors in blood and spleen. Immunol Today 1987; 8:178
- ^{xxxv} Trinchieri G. Biology of natural killer cells. Adv Immunol 1989; 47:187...376.

Отримано: 27 квітня 2009 р.

Прийнято до друку: 27 травня 2009 р.