

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
ХАРКІВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
імені ВАСИЛЯ НАЗАРОВИЧА КАРАЗІНА

Біологічний факультет

Кафедра молекулярної біології та біотехнології

**Зміна гуморальних і клітинних факторів вродженого імунітету після
імунізації експериментальних тварин сироваткою крові хворих на
Covid-19**

Допущено до захисту

«__»_____ 2024 р.

Завідувач кафедри

Оцінка «_____»

Голова ЕК _____

«__»_____ 2024 р.

Кваліфікаційна робота

студентки кафедри

молекулярної біології та біотехнології

Мотузко Дар'ї Андріївни

Науковий керівник:

Д. б. н. Клімова О. М.

Харків, 2024 рік

АНОТАЦІЯ

Кваліфікаційна робота на тему: «Зміна гуморальних і клітинних факторів вродженого імунітету після імунізації експериментальних тварин сироваткою крові хворих на *Covid-19*».

Робота включає: 59 сторінок, використаних джерел – 44.

Мета роботи: оцінити ефекти після імунізації експериментальних тварин сироваткою крові пацієнтів з максимальним вмістом цитотоксичних фракцій *DAMP* та імуномодельюючої біологічно активної субстанції МіксФактор.

Відомо що у пацієнтів після вірусної інфекції SARS-CoV-2 формується так званий постковідний синдром (ПКС), який супроводжується цілим рядом симптомів. Вчені вважають, що симптоми ПКС формуються в результаті наявності патогенних цитотоксичних факторів в організмі людини після перенесеної інфекції. Важливим є вивчення природи цих факторів патогенності, які виникають у пацієнтів, що перехворіли на COVID-19

Для досягнення мети було проведено літературний аналіз щодо впливу цитотоксичних екзогенних факторів на організм: реакція факторів вродженого імунітету (гуморальної та клітинної) та зміна фізіологічних параметрів (вага, температура, поведінкові механізми). Поставлено та проведено експеримент на 15 (5 груп по 3 щура) піддослідних тваринах, у біологічному матеріалі яких визначали наявність цитотоксичних компонентів у сироватці крові (тест Терасакі, тест *Dunaliella viridis* та вміст *DAMPs*), кількість лімфоцитів, нейтрофільних гранулоцитів та моноцитів у крові та фагоцитарну активність нейтрофілів,

Передача компонентів сироватки крові від пацієнтів з ПКС до щурів викликала у останніх появу цитотоксичних компонентів, що призвело до імунопатологічних реакцій. Профілактичне введення експериментальним тваринам біологічно активної речовини з поліфункціональними властивостями змінило початковий функціональний стан їхньої імунної системи та зменшило або усунуло імунозапальні реакції.

Ключові слова: пост-COVID-19 синдром; COVID-19; цитотоксичні компоненти DAMP; фагоцитоз; циркулюючі імунні комплекси; міксфактор.

ABSTRACT

Qualification work on the topic: "Changes in humoral and cellular factors of innate immunity after immunization of experimental animals with serum of patients with Covid-19".

The work includes: 59 pages, references - 44.

Purpose: to evaluate the effects after immunization of experimental animals with the blood serum of patients with the maximum content of cytotoxic fractions of DAMP and immunomodulatory biologically active substance MixFactor.

It is known that patients develop a condition called post-COVID syndrome (PCS) after a SARS-CoV-2 viral infection, which is accompanied by a range of symptoms. Scientists believe that the symptoms of PCS are formed as a result of the presence of pathogenic cytotoxic factors in the human body after the infection. It is important to study the nature of these pathogenic factors that arise in patients who have recovered from COVID-19.

To achieve this goal, a literature analysis was conducted on the effect of cytotoxic exogenous factors on the body: the reaction of innate immunity factors (humoral and cellular) and changes in physiological parameters (weight, temperature, behavioral mechanisms). The experiment was set up and conducted on 15 (5 groups of 3 rats each) experimental animals, in the biological material of which the presence of cytotoxic components in the blood serum (Terasaki test, Dunaliella viridis test and DAMPs content), the number of lymphocytes, neutrophil granulocytes and monocytes in the blood and the phagocytic activity of neutrophils were determined,

The transfer of serum components from patients with PCS to rats caused the appearance of cytotoxic components in the latter, which led to immunopathological reactions. Prophylactic administration of a biologically active substance with multifunctional properties to experimental animals changed

the initial functional state of their immune system and reduced or eliminated immunoinflammatory reactions.

Key words: post-COVID-19 syndrome; COVID-19; cytotoxic components of DAMP; phagocytosis; circulating immune complexes; mix factor.

ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ	8
ВСТУП.....	9
РОЗДІЛ 1. ЛІТЕРАТУРНИЙ ОГЛЯД.....	12
1.1. Система імунітету.....	12
1.1.2. Види імунітету.....	14
1.1.3. Система імунної відповіді: вроджений імунітет	15
1.1.4 Гуморальна ланка імунітету	26
1.2. Ефекти імунізації сироваткою з високим вмістом нуклеотидної та пептидої фракцій експериментальних тварин на фактори вродженого імунітету та вплив міксфактору	32
1.2.1. Дослідження змін у гуморальних факторах після імунізації.....	32
1.2.2. Дослідження змін у клітинних факторах після імунізації.....	33
1.3. Вплив цитотоксичних екзогенних факторів на організм, зміна фізіологічних параметрів (вага, температура, поведінкові механізми)	34
1.4. Про біологічно-активну субстанцію Міксфактор	34
РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ.....	36
2.1. Кількісний аналіз імунокомпетентних клітин.....	36
2.2. Метод визначення фагоцитарної активності нейтрофілів периферичної крові.	37
2.3. Визначення цитотоксичності з використанням одноклітинної водорості <i>dunaliella viridis</i>	38
2.4. Визначення концентрації циркулюючих імунних комплексів.	39
2.5. Визначення лімфоцитотоксичності компонентів сироватки крові (тест Терасакі).	40
2.6. Визначення цитотоксичних компонентів сироватки крові <i>DAMP</i>	40

2.7. Статистичні методи аналізу.	41
РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ І ОБГОВОРЕННЯ.....	42
3.1. Вплив компонентів сироватки крові хворих на вміст циркулюючих імунних комплексів (ЦІК) після їх введення експериментальним тваринам.	43
3.2. Ступінь ураження мембран лімфоцитів у тесті Терасакі аутосироваткою експериментальних тварин.....	45
3.3. Вплив цитотоксичних фракцій сироватки крові на тест культуру <i>D. Viridis</i>	46
3.4. Вплив цитотоксичних фракцій сироватки крові хворих <i>DAMP</i> на фагоцитарну активність нейтрофілів периферичної крові експериментальних тварин.....	48
3.5. Обговорення.....	50
ВИСНОВКИ.....	52
ВИКОРИСТАНА ЛІТЕРАТУРА.....	54

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ

- ЦІК – циркулюючі імунні комплекси
- CRP – С-реактивний білок
- DAMPs – молекулярні структури, пов'язані з пошкодженням
- МФ – Мікс-фактор
- PAMPs – молекулярні моделі, пов'язані з патогеном
- ПКС – пост-COVID-19 синдром
- TNF – фактор некрозу пухлин
- LPS – ліпополісахариди
- PRRs – рецептори розпізнавання паттернів
- TRP – транзиторий рецепторний потенціал
- GPCR – рецептори, сполучені з G-білками
- TREM – активуючі рецептори, експресовані на мієлоїдних клітинах
- RAGE – рецептор для кінцевих продуктів глікування білків
- RLR – рецептор, подібний до RIG-I
- NLR – NOD-подібні рецептори
- CLR – С-тип лектинові рецептори
- TLR - рецептори типу Toll
- MFR - маннозно-фукозні рецептори
- АПК - антигенпрезентуючі клітини
- МАК – мембрано-атакуючий комплекс
- MBL - лектин, що зв'язує маннозу
- ФЧ - фагоцитарне число
- ФІ - фагоцитарний індекс
- ІЗФ - індекс завершеності фагоцитозу

ВСТУП

У сучасному світі, де наука та технології постійно розвиваються, біотехнології відіграють ключову роль у вирішенні проблем, зокрема в галузі імунології. Розвиток біотехнологій відкриває широкі перспективи для вдосконалення імунобіотехнологічних препаратів та збільшення ефективності імунотерапії. Завдяки новим знанням, що з'явилися в результаті цього процесу, були отримані різноманітні препарати, що використовуються для імунізації, та спрямовані на активацію або підтримку імунної відповіді.

Імунна система є сукупністю клітин і молекул, які співпрацюють для захисту від інфекційних агентів. Її функцію можна звести до двох основних ролей: визнання іноземних речовин та організмів та їх ліквідація різноманітними шляхами клітин та молекул, які діють разом, щоб нейтралізувати потенційну загрозу. Внаслідок цього клітини та молекули, які складають вроджену імунну систему, зайняті виявленням певних молекулярних шаблонів, які зазвичай асоціюються з інфекційними агентами. Чарлі Джейнвей назвав такі молекули шаблонами, асоційованими з патогенами (PAMP), і саме ці структури викликають активацію вродженої імунної системи. [2]

Як було вже вказано раніше, багато процесів імунорезистентності та імунного захисту в організмі порушені через пандемію вірусу COVID-19. Пост COVID-19 — це мультисистемний розлад, який зазвичай вражає дихальну, серцево-судинну та кровотворну системи. Крім того, меншою мірою залучаються нервово-психічна, ниркова та ендокринна системи. [9,37,40] Дослідження у лабораторії дали змогу зрозуміти, що основним патогенетичним фактором у хворих з ургентними хірургічними патологіями, що розвинулись на фоні ПКС, є збільшення цитотоксичних фракцій DAMP – молекул, що виникають при пошкодженні клітин

організму. Подібно до PAMP, DAMP взаємодіють з різними PRR (рецепторами визнання патогенів), які знаходяться на поверхні клітин або всередині них. Ці рецептори включають мембранозв'язувальні TLR та CLR, цитоплазматичні NLR, RLR, MDA5, cGAS, AIM2, а також неklasичні трансмембранні білки, такі як RAGE, TREM, GPCR, TRP і P2X7R. Сигнали, що передаються від DAMP до PRR, активують каскадні білки, що призводить до транслокації NF-κB до ядра. Це викликає транскрипцію прозапальних медіаторів та регулює різні клітинні процеси, включаючи апоптоз, проліферацію, адгезію та ангиогенез. Останні дослідження протеоміки плазми виявили збільшення рівня DAMP у пацієнтів з COVID-19, що може призводити до загострення захворювання. Узагальнено, DAMP можуть відігравати як захисну, так і негативну роль для організму у захворюваннях, але в контексті COVID-19, вони відіграють важливу роль у сприянні патологічній запальній відповіді організму. [10]

Актуальність: Відомо що у пацієнтів після вірусної інфекції SARS-CoV-2 формується так званий постковідний синдром (ПКС), який супроводжується цілим рядом симптомів. Вчені вважають, що симптоми ПКС формуються в результаті наявності патогенних цитотоксичних факторів в організмі людини після перенесеної інфекції. Важливим є вивчення природи цих факторів патогенності, які виникають у пацієнтів, що перехворіли на COVID-19.

Для пошуку специфічних терапевтичних методів потрібно провести цілий ряд досліджень. Актуальним є розробка біотехнологічних субстанцій для таргетної корекції порушень імунорезистентності, які формуються при захворюванні Ковід-19 та індукують симптоми ПКС.

Мета дослідження: оцінка ефектів після імунізації експериментальних тварин сироваткою крові пацієнтів з максимальним вмістом цитотоксичних фракцій DAMP.

Задачі: Оцінити імуотропну дію біологічної субстанції MixFactor на експериментальних тваринах за показниками:

- 1) клітинного імунітету - кисневонезалежного фагоцитозу;
- 2) гуморального імунітету: цитотоксичності та лімфоцитоксичності компонентів сироватки;
- 3) зміни концентрації циркулюючих імунних комплексів;

РОЗДІЛ 1. ЛІТЕРАТУРНИЙ ОГЛЯД.

1.1. Система імунітету

Система імунітету (СІ) - це сукупність клітин, органів і тканин, що здійснюють імунні реакції. Вона включає кілька самостійних підсистем, які реагують як єдине ціле:

1. Лімфоїдна система (лімфоцити) - утворює специфічні фактори імунітету (антитіла і Т-клітки, специфічні до антигену).
2. Натуральні кілери (НК).
3. Система гранулоцитів. Включає нейтрофільні, базофільні і еозинофільні лейкоцити.
4. Система моноклеарних фагоцитів (моноцити, макрофаги).
5. Гуморальні фактори неспецифічного природного імунітету: лізоцим, С-реактивний білок (CRP), інтерферони, рилізини, лектини і інше.
6. Система комплементу.
7. Система тромбоцитів.
8. Дендритні клітини.

Імунітет - це еволюційно обумовлена сукупність реакцій взаємодії між системою імунітету та біологічно активними агентами (антигенами). Ці реакції спрямовані на збереження фенотипічної стійкості внутрішнього середовища (гомеостазу) організму, і їхнім результатом можуть бути різні феномени та реакції імунітету. Деякі з них є корисними, захисними, інші викликають патологію.

До перших належать:

- Протиінфекційний імунітет - набута специфічна невразливість організму до конкретних інфекційних агентів-збудників захворювань (мікробів, вірусів).

- Толерантність - терпимість, відсутність відповіді системи імунітету на власні біологічно активні речовини.

Інші реакції імунітету призводять до розвитку захворювань:

- Гіперчутливість - підвищена імунна («імунітетна») реакція на антигени-алергени, що призводить до розвитку захворювань. Вона може мати два види: на екзогенні алергени - алергія; на ендогенні, власні біомолекули - аутоалергія (аутоімунні реакції).

- Аутоімунність - це реакції системи імунітету на власні (не чужорідні) речовини, тобто на аутоантигени. При аутоалергічних (аутоімунних) захворюваннях "свої" молекули сприймаються системою імунітету як "чужі", і на них розвиваються реакції. Система імунітету зазвичай не реагує на "своє" і відкидає "чуже".

- Анергія, тобто відсутність реакції на інфекційні агенти (варіант толерантності), може бути причиною інфекцій і обумовлена недостатністю протиінфекційного імунітету.

Основою реалізації реакцій імунітету є імунологічна пам'ять. Суть її полягає в тому, що клітини системи імунітету "пам'ятають" про ті чужорідні речовини, з якими вони зустрічалися і на які реагували. Імунологічна пам'ять лежить в основі явищ протиінфекційного імунітету, толерантності і гіперчутливості. Реакції імунітету завжди спрямовані на підтримку фенотипічного гомеостазу організму і елімінацію чужорідних молекул, але часто супроводжуються пошкодженням власних тканин організму - запаленням. [3]

1.1.2. Види імунітету

Існують механізми "неімунного", **природного неспецифічного опору** організму. До них відносяться захист організму від зовнішніх агентів: зовнішніми покривами (шкіра, слизові оболонки), механічними (відшаровування епітелію, рух війок і секретів, слизових оболонок, чхання, кашель), фізичними механізмами (бар'єри), хімічними речовинами (бактерицидна дія солей, молочної, жирних кислот, ряду ферментів, особливо лізоциму - мурамідази).

Видова нечутливість (конституційний, спадковий імунітет) - це варіант неспецифічного опору організму, генетично умовлений особливостями обміну речовин даного виду. Він в основному пов'язаний з відсутністю умов, необхідних для розмноження збудника. Наприклад, тварини не хворіють на деякі хвороби людини (сифіліс, гонорея, дизентерія), і, навпаки, люди нечутливі до збудника чуми собак. Цей варіант опору не є справжнім імунітетом, оскільки він не здійснюється системою імунітету. Однак існують варіанти видового імунітету, обумовлені природними, передусім існуючими антитілами. Такі антитіла вже існують в організмі в невеликій кількості проти багатьох бактерій і вірусів.

Від неспецифічного, "неімунного" опору слід відрізнити неспецифічні фактори імунітету або природний **вроджений імунітет**. Вони включають клітини та гуморальні фактори. Це фагоцити (моноцити, макрофаги, поліморфноядерні лейкоцити), які проявляють свою активність в усіх тканинах, порожнинах, можуть виходити на поверхню слизових оболонок і там виконувати захисну функцію. Гуморальні фактори неспецифічного імунітету також різноманітні: система комплемента, неспецифічні глобуліни, С-реактивний білок, фермент лізоцим, інтерферони, цитокіни та ін.

Протиінфекційний набутий імунітет (**набутий імунітет**) - це сукупність реакцій системи імунітету, спрямованих на вилучення

інфекційного агента - збудника захворювання. Цей імунітет залежить від специфічних факторів імунітету, якими служать антитіла - продукти В-лімфоцитів і Т-лімфоцити, що мають специфічний рецептор до антигену (ТКР - TCR).

Природний активний імунітет виникає в результаті контакту з збудником (після перенесеної хвороби або прихованого контакту без прояву симптомів хвороби), а **пасивний імунітет** виникає внаслідок передачі від матері до плода через плаценту (трансплацентарний) або через молоко готових захисних факторів - лімфоцитів, антитіл, цитокінів та ін.

Штучний активний імунітет викликається після введення в організм вакцин, що містять мікроорганізми або їх антигени. **Штучний пасивний імунітет** створюється після введення в організм готових антитіл або імунних кліток. Такі антитіла містяться у сироватці крові імунізованих донорів або тварин. [3]

1.1.3. Система імунної відповіді: вроджений імунітет

Вроджений імунітет представляє собою перший рівень захисту від вторгнення патогену. Це антиген-незалежний (неспецифічний) механізм оборони, який використовується організмом негайно або протягом деякого часу після зустрічі з антигеном. Вроджена імунна відповідь не має імунологічної пам'яті і, отже, вона не здатна визнати або "запам'ятати" той самий патоген, якщо організм буде викладений йому у майбутньому.

Вроджений імунітет можна розглядати як сукупність чотирьох типів захисних бар'єрів: анатомічних (шкіра та слизова оболонка), фізіологічних (температура, низький рН та хімічні посередники), ендокитних та фагоцитних, і запальних. Вроджений імунітет до патогенів ґрунтується на рецепторах розпізнавання паттернів (PRRs), які дозволяють обмеженому колу імунних клітин виявляти та швидко реагувати на широкий спектр

патогенів, що мають спільні структури, відомі як шаблони, асоційовані з патогенами (PAMPs). Приклади таких включають компоненти клітинної стінки бактерій, такі як ліпополісахариди (LPS), і дволанцюгову рибонуклеїнову кислоту (RNA), що утворюється під час вірусної інфекції.

Важливою функцією вродженого імунітету є швидке переміщення імунних клітин до місць інфекції та запалення за рахунок вироблення цитокінів та хемокінів (малих білків, що беруть участь у комунікації та рекрутингу клітин). Виробництво цитокінів під час вродженої імунної відповіді мобілізує багато захисних механізмів по всьому організму, а також активує місцеві клітинні відповіді на інфекцію або пошкодження. Ключовими запальними цитокінами, що вивільняються під час ранньої відповіді на бактеріальну інфекцію, є: фактор некрозу пухлин (TNF), інтерлейкін 1 (IL-1) та інтерлейкін 6 (IL-6). Ці цитокіни є критичними для ініціювання рекрутингу клітин та місцевого запалення, яке є необхідним для знищення багатьох патогенів. Вони також сприяють розвитку лихоманки. Дисрегульоване виробництво таких запальних цитокінів часто пов'язане з запальними або аутоімунними захворюваннями.

Система комплементу є біохімічним каскадом, що функціонує для ідентифікації та опсонізації бактерій та інших патогенів. Вона робить патогени вразливими до процесів фагоцитозу, за якого імунні клітини поглинають мікробів і видаляють клітинні залишки, а також вбивають деякі патогени та інфіковані клітини безпосередньо. Фагоцитарна дія вродженої імунної відповіді сприяє очищенню від мертвих клітин або комплексів антитіл та видаленню антигенів, присутніх в органах, тканинах, крові та лімфі. Вона також може активувати адаптивну імунну відповідь за рахунок мобілізації та активації клітин, які презентують антигени. [16,36]

Клітини вродженої імунної відповіді

Багато клітин беруть участь у вродженій імунній відповіді, наприклад: фагоцити (макрофаги та нейтрофіли), дендритні клітини, мастоцити, базофіли, еозинофіли, клітини-вбивці природи (NK-клітини) та вроджені лімфоїдні клітини.

Нейтрофіли і макрофаги.

Здатність до ендоцитозу, тобто поглинання частинок з утворенням внутрішньоклітинної вакуолі, властива всім еукаріотичним клітинам, проте більшість з них не має механізмів деструкції поглиненого патогена. У процесі еволюції у багатоклітинних організмах виділилась група клітин, які мають потужні системи внутрішньоклітинного знищення за рахунок фагоцитозу. Цей процес передбачає поглинання частинок діаметром більше 0,1 мкм (на відміну від піноцитозу, який включає поглинання частинок меншого діаметру і макромолекул) з подальшим їх знищенням. До цієї групи клітин належать поліморфно-ядерні лейкоцити та мононуклеарні фагоцити. Відкриття феномену фагоцитозу належить І. І. Мечникову (1883).

Нейтрофіли (нейтрофільні гранулоцити, нейтрофільні лейкоцити, сегментоядерні нейтрофіли) - це найбільш численна і рухлива популяція фагоцитів, що дозріває в кістковому мозку. Понад 70% нейтрофілів знаходяться саме там і виходять під впливом відповідних стимулів. Вони можуть негайно переміщатися через кров до місця тканинної деструкції, де беруть участь у розвитку гострої запальної реакції. Нейтрофіли - це короткоживучі клітини з тривалістю життя близько 15 днів. Вони виходять з кісткового мозку як зрілі клітини, що вже втратили здатність до диференціації та проліферації

Після переходу з крові до тканин, де вони або гинуть, або виходять на поверхню слизових оболонок, нейтрофіли завершують свій життєвий цикл. Нейтрофільна реакція - це перша відповідь на бактеріальні та багато інші інфекції. Нейтрофільна відповідь при гострих запаленнях і інфекціях

завжди передує більш специфічній лімфоцитарній відповіді. При хронічних запаленнях і інфекціях роль нейтрофілів невелика, оскільки переважає лімфоцитарна відповідь (інфільтрація осередок запалення лімфоцитами, абсолютний або відносний лімфоцитоз у крові).

Мононуклеарні фагоцити представлені промоноцитами кісткового мозку, моноцитами крові та тканинними макрофагами. Моноцити, на відміну від нейтрофілів, є незрілими клітинами, які, потрапляючи в кров'яний потік, а потім у тканини, дозрівають у тканинні макрофаги. Моноцити можуть не диференціюватися у тканинні макрофаги, якщо вони потрапляють з крові безпосередньо в осередок запалення і здійснюють фагоцитоз, розмножуючись при цьому поділом.

Тривалість життя мононуклеарних фагоцитів від 40 до 60 днів. Макрофаги - не дуже швидкі клітини, але вони розкидані у всіх тканинах і, на відміну від нейтрофілів, не мають можливості для такої термінової мобілізації.

Важливою особливістю нейтрофілів і макрофагів є наявність у їх цитоплазмі великої кількості лізосом - гранул розміром 200-500 нм, які містять різні ферменти, бактерицидні та біологічно активні продукти, що також містяться у більшості біологічних рідин (сльюна, сльози, молоко, назальний слиз та ін.). Серед них особливу важливість мають:

- лізоцим - фермент мурамідаза, що розщеплює пептидоглікан клітинної стінки бактерій муреїн, які містяться особливо великою кількістю в клітинних стінках грампозитивних бактерій;

- лактоферрин - пептид, що зв'язує залізо, перешкоджаючи тим самим доступу бактерій до нього;

- дефензини - білкові молекули, які інтегруються в клітинну мембрану мікробних клітин, утворюючи пори (альфа-дефензини утворюються у нейтрофілах, а бета-дефензини - у епітеліоцитах слизових оболонок);

- катепсини - протеази, особливо активні у лізосомах (у нейтрофілах присутні катепсини типу С);

- мієлопероксидаза - фермент лізосом нейтрофілів, що утворює гіпохлоритні іони, які, будучи сильними окисниками, мають ненапрявлену бактерицидну дію;

- інші ферменти з протеолітичною (протеїнази, колагенази тощо) та мікробіцидною (бактерицидні білки тощо) активністю.

Всі типи фагоцитуючих клітин здатні реагувати на найменші зміни в навколишньому середовищі, що забезпечується численними та багатофункціональними рецепторними системами:

- Рецептори типу Toll (TLR), які впізнають не антигени, що є надзвичайно різноманітними (близько 1018 варіантів), а більш грубі повторювані молекулярні вуглеводні та ліпідні візерунки - pattern-структури (кількість варіантів таких візерунків близько 20), яких немає на клітинах організму господаря, але які присутні у простіших організмів, грибів, бактерій та вірусів.

- Маннозно-фукозні рецептори (MFR), які впізнають вуглеводні компоненти поверхневих структур мікробів.

- Рецептори для сміття (scavenger receptor), що забезпечують зв'язування фосфоліпідних мембран та компонентів власних пошкоджених та вмираючих клітин у процесі їх фагоцитозу.

- Рецептори для компонентів комплементу С3b та С4b;

- Рецептори для Fc-фрагментів імуноглобулінів, які, подібно до рецепторів для компонентів комплементу, відіграють важливу роль у зв'язуванні імунних комплексів та фагоцитозі бактерій, помічених імуноглобулінами та комплементом (опсонізаційний ефект);

- Рецептори для цитокінів, хемокінів, гормонів, лейкотриїнів, простагландинів і т.д., які дозволяють взаємодіяти з лімфоцитами та реагувати на будь-які зміни внутрішнього середовища організму.

Основною функцією нейтрофілів і макрофагів є фагоцитоз - процес поглинання кліткою частинок або великих макромолекулярних комплексів, який проходить через кілька послідовних етапів:

- 1) активація, хемокінез і хемотаксис - цілеспрямоване рух клітки до об'єкту фагоцитозу в напрямку збільшення концентрації хемоаттрактантів, роль яких відіграють компоненти комплементу та мікробна клітина, продукти деградації тканин організму (хемотаксис) або загальне збільшення безладної рухової активності кліток під впливом хемокінів (хемокінез);
- 2) адгезія частинок до поверхні фагоцита, важливу роль в якій відіграють рецептори типу Toll, які забезпечують реалізацію неспецифічного (неімунного) фагоцитозу. Крім того, для адгезії можуть рецептори до фрагменту Fc імуноглобулінів M та G, компонентам комплементу C3b та C4b, які відомі як опсоніни (забезпечують зв'язок між фагоцитом та чужорідним агентом) та сприяють реалізації імунного фагоцитозу;
- 3) поглинання часток, їх занурення в цитоплазму та утворення вакуолі - фагосоми;
- 4) утворення фаголізосоми, в якій бактерії гинуть під впливом бактерицидних продуктів гранул (кисневозалежна система бактерицидності). Одночасно в клітині збільшується споживання кисню та глюкози, що призводить до респіраторного (окислювального) вибуху з утворенням токсичних метаболітів кисню та азоту (H_2O_2 , супероксиданіон O_2^- , гіпохлорна кислота, піроксинітрил), що мають високу бактерицидність (кисневозалежна система бактерицидності);

5) виділення продуктів розкладу з фаголізосоми шляхом екзоцитозу, при цьому мікроби в фаголізосомі можуть бути знищені факторами агресії фагоцитів (завершений фагоцитоз), а можуть завдяки особливостям своєї будови або метаболізму блокувати своє роз'єднання (незавершений фагоцитоз) та виділятися з фагоцитів у життєздатному стані.

При незавершеному фагоцитозі мікроби можуть не лише зберігати життєздатність, а й розмножуватися всередині фагоцитуючих клітин. Це досягається завдяки наявності у них способів захисту від агресивних факторів фагоцитів, до яких належать:

- Виробництво мікробами екзотоксину лейкоцидину, що руйнує фагоцити (наприклад, стафілококи, стрептококи групи А, анаеробні клостридії).
- Пригнічення опсонізації та уникнення поглинання фагоцитами (стафілококи, стрептококи);
- Уникнення процесінгу шляхом виходу в цитоплазму фагоцитів з фагосоми до її злиття з лізосоною;
- Пригнічення злиття фагосоми з лізосоною мікробом (мікобактерії);
- Стійкість до дії факторів агресії фагоцитів (нейссерії) та інше.

Фагоцити, крім фагоцитозу (ендоцитозу), можуть здійснювати свої цитотоксичні реакції шляхом екзоцитозу - виділення своїх гранул назовні (дегрануляція) з подальшим позаклітинним кілінгом. Нейтрофіли, на відміну від макрофагів, здатні формувати позаклітинні бактерицидні пастки - під час активації клітина викидає назовні нитки ДНК, на яких розміщуються гранули з бактерицидними ферментами. Завдяки липкості ДНК бактерії приклеюються до пасток і під впливом ферменту гинуть.

Нейтрофіли та макрофаги є важливими ланками вродженого імунітету, проте їх роль у захисті від різних мікробів відрізняється.

Нейтрофіли ефективні при інфекціях, викликаних позаклітинними патогенами (гноєродні коки, ентеробактерії та ін.), що індукують розвиток гострої запальної відповіді. У таких інфекціях ефективна співпраця нейтрофіл-комплемент-антитіло. Макрофаги захищають від внутриклітинних патогенів (мікобактерії, риккетсії, хламідії та ін.), що викликають розвиток хронічного гранулематозного запалення, де головну роль відіграє співпраця макрофаг-Т-лімфоцит.

Крім участі в антимікробному захисті, фагоцити беруть участь у видаленні з організму вмираючих, старих клітин та продуктів їх розпаду, неорганічних частинок (пил, мінеральна пиля та ін.). Фагоцити (особливо макрофаги) є антигенпрезентуючими клітинами (АПК); вони мають секреторну функцію, синтезують та виділяють назвні широкий спектр біологічно активних сполук: цитокіни (інтерлейкіни-1, 6, 8, 12, фактор некрозу пухлини), простагландини, лейкотриєни, інтерферони α та γ . Завдяки цим медіаторам фагоцити активно беруть участь у підтримці гомеостазу, в процесах запалення, в адаптивній імунній відповіді та регенерації. [16]

Еозинофіли

Еозинофіли (еозинофільні гранулоцити, сегментоядерні еозинофіли, еозинофільні лейкоцити) відносяться до поліморфно-ядерних лейкоцитів. Вони відрізняються від нейтрофілів тим, що мають слабку фагоцитарну активність: хоча вони і здатні засмоктати деяких мікробів, внутрішньоклітинне вбивство у них менш ефективне, ніж у нейтрофілів.

Основна функція еозинофілів - експресія Fc-рецепторів, специфічних для IgE. Фізіологічно це проявляється в потужних цитотоксичних властивостях еозинофілів, а не в їх фагоцитарних властивостях, і активному участі у протипаразитарному імунітеті. Еозинофіли реалізують цитотоксичну дію через вплив на найпростіших катіонними білками, РНК-

азами, пероксидазою та іншими факторами агресії. Більшість цих факторів спричиняють утворення трансмембранних пор в клітинах паразитів, що призводить до їх гибелі. Однак підвищена продукція IgE може призвести до алергічної реакції негайного типу (анафілактичний шок), що є головним механізмом всіх алергій такого типу.

Крім того, еозинофіли здатні поглинати та зв'язувати гістамін та ряд інших медіаторів алергії та запалення. Вони мають здатність при необхідності виділяти ці речовини, подібно до базофілів. Тобто еозинофіли можуть виконувати як проалергічну, так і захисну антиалергічну роль. Вміст еозинофілів у крові збільшується при алергічних станах. [16]

НК-клітини

Натуральні кілери (НК-клітини) - великі гранулярні лімфоцити, які володіють цитотоксичністю проти опухолевих клітин та клітин, інфікованих вірусами. Вони є одним із найважливіших компонентів клітинного вродженого імунітету. НК-клітини не мають Т-клітинних рецепторів, але зазвичай несуть на своєму поверхні маркери CD16 і CD56. Вони виконують цитотоксичні і цитокін-продукуючі функції, а також формуються в результаті диференціації лімфобластів. Вони не мають Т-клітинних рецепторів, CD3 або поверхневих імуноглобулінів, проте зазвичай несуть на своїй поверхні маркери CD16 та CD56. Приблизно 80 % з них несуть рецептор CD8. Природні кілери не володіють фагоцитарною активністю, проте мають значну кількість лізосом, вміст яких шляхом екзоцитозу виділяється у неклітинне середовище при активації натуральних кілерів та забезпечує цитотоксичний ефект.

НК-клітини мають фактори цитотоксичності, такі як перфторин і протеази, що містяться в лізосомах. Перфторин утворює трансмембранні пори в клітинній мембрані, що дозволяє проникнення протеаз і інших молекул у клітину, що призводить до апоптозу або осмотичного лізису

клітини. Вибір між апоптозом і лізисом має велике значення, оскільки при лізисі інфікованої вірусом клітини відбудеться вивільнення віріонів, а апоптоз призведе до руйнування вірусів разом з клітиною.

Основна функція НК-клітин - знищення клітин організму, що не несуть на своїй поверхні МНС I (маркери здорових клітин організму) і, відповідно недоступних для основного компонента противірусного компоненту імунітету – Т-кілерів. Зменшення кількості МНС I на поверхні клітини може бути наслідком трансформації клітини в пухлинну або дією деяких вірусів (наприклад, папіломавірус або ВІЛ). В активації НК-клітин беруть участь інтерлейкіни 1, 2, 12, 15, 18; фактор некрозу пухлини та інтерферони. [16]

Базофіли

Базофіли (базофільні лейкоцити, базофільні гранулоцити, сегментоядерні базофіли) - дуже великі гранулоцити: вони більші, ніж нейтрофіли та еозинофіли. Гранули базофілів містять велику кількість гістаміну, серотоніну, лейкотрієнів, простагландинів та інших медіаторів алергії та запалення. Базофіли активно беруть участь у розвитку алергічних реакцій негайного типу (реакції анафілактичного шоку). Варто розрізнити базофіли від тучних клітин, що знаходяться у тканинах. Базофіли виходять з кісткового мозку вже зрілими, тоді як тучні клітини циркулюють у незрілому вигляді і лише з часом потрапляють у тканини. Базофіли несуть на поверхні IgE і можуть дегранулювати або аутолізуватися при контакті з антигеном-аллергеном. Під час дегрануляції або лізису базофілів вивільняється велика кількість гістаміну, серотоніну, лейкотрієнів, простагландинів та інших біологічно активних речовин, що призводить до проявів алергії та запалення при впливі алергенів.

Базофіли здатні до екстравазації (еміграції за межі кровоносних судин), а також можуть існувати поза кровоносним руслом, стаючи

резидентними тканинними тучними клітинами. Вони мають здатність до хемотаксису та фагоцитозу, проте, ймовірно, фагоцитоз не є основною або природною активністю базофілів в умовах фізіології. Основна функція базофілів - миттєва дегрануляція, що призводить до збільшення кровотоку, підвищення проникності судин, збільшення припливу рідини та інших гранулоцитів у осередок запалення. Іншими словами, головна функція базофілів полягає у мобілізації інших гранулоцитів у осередок запалення. [16]

Дендритні клітини

Дендритні клітини - це гетерогенна популяція антиген-презентуючих клітин кісткового мозку - великі клітини (15-20 мкм) круглої, овальної або багатокутної форми з ексцентрично розташованим ядром та численними розгалуженими відростками мембрани. Існують два типи дендритних клітин: мієлоїдні (тобто походження з кісткового мозку) та плазмоцитоїдні (тобто походження з лімфоїдної тканини).

Мієлоїдні дендритні клітини захоплюють чужорідні антигени шляхом піно- та фагоцитозу, після чого експресують антигенну детермінанту в комплексі з молекулами МНС II класу. Потім дендритні клітини мігрують до регіонарних лімфатичних вузлів, де стимулюють проліферацію та диференціацію антиген-специфічних Т-лімфоцитів, тим самим ініціюючи та стимулюючи адаптивну імунну відповідь.

Плазмоцитоїдні дендритні клітини виділяють велику кількість інтерферонів I типу (α та β), що робить їх основними інтерферон-продукуючими клітинами крові, а також інтерлейкіни 4 і 10.

Основною функцією обох типів дендритних клітин є презентація антигенів Т-лімфоцитам. Дендритні клітини також виконують важливі імунорегуляторні функції, такі як контроль диференціації Т-лімфоцитів та регуляція активації та супресії імунної відповіді. Важливою особливістю

дендритних клітин є їх здатність захоплювати різні антигени з навколишнього середовища за допомогою піноцитозу та рецептор-опосередкованого ендоцитозу. Найбільше дендритних клітин знаходиться в тканинах, які межують з зовнішнім середовищем, наприклад, в епітеліальному шарі слизової оболонки кишечника, в підслизистій респіраторного, шлунково-кишкового та сечовидільного трактів.

Дендритні клітини засвоюють антигени, оброблюють їх та представляють на своєму поверхні в комплексі з МНС I або МНС II класів. Тільки в такому вигляді Т-клітки можуть впізнати антиген, після чого активуватися та розвинути імунну відповідь. [16]

1.1.4 Гуморальна ланка імунітету

Система комплементу

Система комплементу – це багатоконпонентна поліферментна система сироваткових білків, що самозбирається, яка в нормі знаходяться в неактивному стані. З появою у внутрішньому середовищі мікробних продуктів запускається процес, який називають активацією комплементу. Активація протікає на кшталт каскадної реакції, коли кожен попередній компонент системи активує наступний. [1]

До складу системи комплементу входить понад 20 білків, які синтезуються у печінці та становлять понад 5% глобулінової фракції білків сироватки крові. У систему комплементу входить 9 основних білків (які позначаються як C1, C2, C3 і так до C9), а також субкомпоненти продукти розщеплення цих білків (C1g, C3b, C4b, C3a та ін) та ряд інших регуляторних білків (фактор В, фактор D, пропердин Р та ін).

У процесі самоскладання системи утворюються активні продукти розпаду білків, які виконують численні функції компонентів та продуктів системи комплементу.

У нормі, коли внутрішнє середовище організму «стерильне» і патологічного розпаду власних тканин немає, рівень активності системи комплементу невисокий, та її компоненти перебувають у неактивному стані. З появою у внутрішньому середовищі мікробних продуктів або імунних комплексів відбувається активація системи комплементу, яка може відбуватися 3 шляхами: альтернативним, класичним та лектиновим, при цьому для всіх шляхів активації системи комплементу потрібна наявність достатніх кількостей магнію та кальцію.

При класичному шляху активації системи комплементу фактором, що активує, є комплекси антиген-антитіло. При цьому Fc-фрагмент IgM і IgG імунних комплексів активує Cг-субкомпонент системи комплементу, Cг розщеплюється з утворенням C15, гідролізуючого C4, який розщеплюється на C4a (анафілотоксин) і C4b. C4b активує C2a, який, своєю чергою, активізує C3-компонент (ключовий компонент системи). C3-компонент розщеплюється на анафілотоксин C3 та опсонін C3b, які активують C5-компонент. Активація C5 компонента комплементу також супроводжується утворенням 2 активних фрагментів білків: C5a анафілотоксину і хемоаттрактанту для нейтрофілів і C5b, що активує C6 компонент і т.д. до компонента C9 з утворенням МАК, який формує пори у клітинній стінці та призводить до загибелі клітини-мішені (крім грампозитивних бактерій). [5]

Лектиновий шлях активації системи комплементу багато в чому аналогічний класичному. Відмінність полягає лише в тому, що в даному випадку один з білків гострої фази запалення MBL-білок (MBL, mannose binding lectin, що зв'язує маннозу лектин) взаємодіє з маннозою на поверхні мікробних клітин та утворює прообраз комплексу антиген-антитіло з MBL-білка та маннози мікробної клітини. Цей комплекс активує C4 та C2 компоненти системи комплементу, а подальший каскад подій аналогічний такому при класичному шляху активації.

Альтернативний шлях активації системи комплементу йде без участі антитіл і перших 3 компонентів (C1, C4 та C2) каскаду. Ініціюють альтернативний шлях компоненти клітинної стінки грамнегативних бактерій (ліпополісахариди та пептидоглікани), віруси, які зв'язуються послідовно з білком Р (пропердин) та факторами В та D. Ці комплекси безпосередньо конвертують C3-компонент і запускають подальший каскад реакцій. [5]

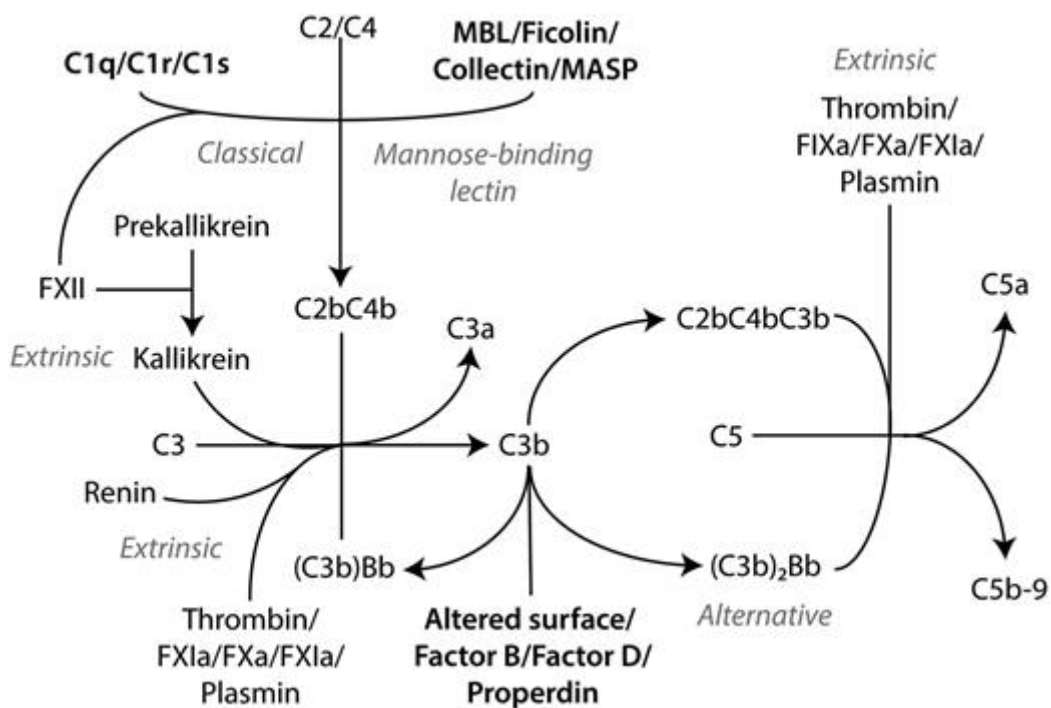


Рис. 1.1.4. Шляхи активації комплементу. Неактивні молекули та продукти розщеплення на хвостах і наконечниках стріл відповідно; пересічні лінії позначають протеолітичне розщеплення; шляхи виділено сірим курсивом; а механізми виявлення патогенів і DAMP наведені жирним шрифтом. [34]

Комплемент-опосередковане гіперзапалення

Комплемент має дихотомічну природу, охоплюючи різні діапазони концентрацій. У відповідь на низьку або помірну імунне стимулювання,

комплемент викликає локалізовану запальну реакцію, яка видаляє небезпечні агенти та сприяє відновленню тканин. Ці процеси суворо регулюються та обмежуються, і дійсно, низькі концентрації комплементу можуть інгібувати вироблення цитокінів [35]. Таким чином, концентрації C5a в сироватці/плазмі рідко перевищують 10 нМ у цьому контексті [36].

На противагу, у відповідь на високий рівень імунного стимулювання комплемент може стати неконтрольованим і викликати гіперзапалення. У такому стані комплемент стає дезадаптивним і може завдати значної шкоди. Зокрема, нейтрофіли стають нечутливими до анафілотоксинів, що підриває їх антимікробну активність; макрофаги виробляють надмірну кількість цитокінів, що сприяє утворенню цитокінових штормів; а ендотеліальні клітини виробляють тканинний фактор (TF), який призводить до дисемінованого внутрішньосудинного згортання (DIC). Ці процеси пов'язані з концентраціями C5a в сироватці/плазмі вище 10 нМ, як це спостерігається у пацієнтів із тяжкою формою COVID-19.

Розчинні рецептори для патогенів.

Розчинні рецептори для патогенів це білки крові, що безпосередньо зв'язуються з різними консервативними, повторюваними вуглеводними або ліпідними структурами мікробної клітини (pattern-структурами). Ці білки мають опсонічні властивості, а деякі з них активують комплемент. Основну частину розчинних рецепторів становлять білки гострої фази. Концентрація цих білків у крові швидко наростає у відповідь розвиток запалення при інфекції чи пошкодженні тканин. До білків гострої фази відносяться:

- С-реактивний білок (СРБ, що становить основну масу білків гострої фази) синтезується у печінці у відповідь на підвищення концентрації інтерлейкіну-6, зв'язується з фосфорилхоліном (С-полісахаридом) мікробів з утворенням комплексу «С-реактивний білок фосфорилхолін», що сприяє фагоцитозу бактерій, оскільки комплекс

зв'язується із C1g-компонентом системи комплементу та активує класичний шлях її активації.

- Сироватковий амілоїд Р, близький за структурою та функцією до С-реактивного білку.
- Лектин, що зв'язує маннозу (MBL), синтезується в печінці, активує комплемент по лектиновому шляху і є одним із представників сироваткових білків-колектинів, що розпізнають вуглеводні залишки.
- Білки сурфактанту легень також належать до сімейства колектинів і мають опсонічну властивість, особливо щодо одноклітинного гриба *Pneumocystis carinii*
- Білки, що зв'язують залізо (трансферин, гаптоглобін, гемопексин), перешкоджають розмноженню бактерій, які потребують цього елемента.

Інтерферони

Інтерферони (ІНФ) - група глікопротеїнів, які мають протівірусну активність. Як фактори протівірусного захисту інтерферони були відкриті у 1957 р. А. Isaacs та J. Lindenmann. Виділяють інтерферони 3 типів:

- тип 1 включає ІНФ (альфа), ІНФ (бета), ІНФ (капа), ІНФ (омега), ІНФ (епсілон), з яких головна участь у вродженому протівірусному імунітеті належить ІНФа та ІНФВ;
- тип 2 включає ІНФ (гама) синтезується лімфоцитами у відповідь на антигензалежну стимуляцію (розглядаються в наступних розділах посібника);
- тип 3 включає нещодавно відкриті інтерфероподібні цитокіни - інтерлейкіни (ІЛ): ІНФ-Х1 (лямбда-1, ІЛ-29), ІНФ-12 (ІЛ-28А) та ІНФ-А3 (ІЛ-28В), роль яких продовжує уточнюватися, проте відомо, що продукція ІНФ ІІІ типу здійснюється моноцитами та дендритними

клітинами у відповідь на вірусну інфекцію та стимуляцію лігандами Toll-подібних рецепторів.

Вважають, що основним джерелом ІНФ типу 1 в організмі є плазмоцитоїдні дендритні клітини. Інтерферони синтезуються цими клітинами постійно, а їх концентрація у крові в нормі мало змінюється. Однак продукція ІНФ посилюється при зараженні клітин вірусами або дії його індукторів – інтерферогенів (вірусної РНК, ДНК, складних полімерів). Індуктором синтезу ІНФ *in vivo* служать молекули двоспіральної РНК, яка може бути геномною РНК вірусів або проміжним продуктом транскрипції у ДНК-вірусів, а в клітинах організму людини відсутня. [31]

ІНФ не мають прямої противірусної активності, їх дія опосередкована. Так, ІНФ типу I зв'язуються зі специфічними рецепторами на поверхні багатьох типів клітин імунної системи та стимулюють противірусну та в деяких випадках протипухлинну імунну відповідь.

В даний час інтерферони (як лейкоцитарні, так і рекомбінантні, тобто отримані в результаті синтезу) та інтерферогени широко застосовуються в клінічній практиці для профілактики та лікування гострих вірусних інфекцій (грип), а також з терапевтичною метою при хронічних вірусних інфекціях (гепатити В, С, герпес, розсіяний склероз та ін.). Оскільки інтерферони мають не тільки противірусну, але й протипухлинну активність, вони застосовуються також для лікування онкологічних захворювань.

Механізм дії індукторів інтерферону базується на втручанні в сигнальну систему імунних клітин з впливом на транскрипцію генів, побічні ефекти бувають досить серйозними (аж до розвитку пухлинних захворювань), а їх застосування актуальне лише в тому випадку, коли потенційна шкода нижче за очікуваний ефект. [4,16]

1.2. Ефекти імунізації сироваткою з високим вмістом нуклеотидної та пептидої фракцій експериментальних тварин на фактори вродженого імунітету та вплив міксфактору

1.2.1. Дослідження змін у гуморальних факторах після імунізації

З роботи Клімової О. М. та ін. [8] стало відомо, що компоненти сироватки крові хворих на ПКС індукували посилення проліферації та диференціації імунокомпетентних клітин у щурів, а профілактичне введення МФ практично не впливало на цей процес.

Дослідження також показало, що введення сироватки крові хворих на ПКС супроводжувалося значним підвищенням ступеня лімфоцитотоксичності у щурів у 2,8 разів порівняно з контрольною групою. Проте, якщо тваринам перед введенням сироватки крові ПКС-пацієнтів раніше ввели МФ, то ступінь лімфоцитотоксичності знизився на 20%, але залишився вищим у 2 рази за контрольні значення.

Концентрація компонентів комплементу С3 та С4 у сироватці крові тварин, які отримували лише МФ, була підвищена на 50% та 75% відповідно порівняно з контролем. У тварин, яким вводили сироватку крові хворих на ПКС, концентрації компонентів комплементу С3 і С4 підвищувалися в меншій мірі, ніж після введення тільки МФ, але їх вміст був підвищений порівняно з контролем. Профілактичне введення субстанції МФ тваринам з подальшим введенням сироватки крові хворих на ПКС пригнічувало активацію компонента С3, а вміст компонента С4 підвищувався порівняно з тваринами, які отримували лише сироватку крові хворих з ПКС.

Введення субстанції МФ тваринам супроводжувалося збільшенням кількості ЦК у 2,4 рази порівняно з контролем, що свідчить про посилення опсонізуючої дії антитіл і комплементу. Якщо тваринам вводили сироватку крові хворих на ПКС, то це також супроводжувалося підвищенням вмісту ЦК у сироватці крові таких тварин, але лише на 50% порівняно з контролем.

Якщо дослідним тваринам попередньо перорально вводили субстанцію МФ, а потім сироватку крові ПКС-хворих, то у таких тварин вміст ЦІК істотно не змінювався порівняно з контролем.

1.2.2. Дослідження змін у клітинних факторах після імунізації

У ході дослідження [8] киснево-незалежного фагоцитозу акридиновим помаранчевим утворення НЕТ не було виявлено в усіх досліджуваних тваринах. Водночас, у тварин, яким вводили речовину МФ, спостерігалось збільшення кількості клітин, що вступали у фагоцитоз. Нейтрофіли піддавалися частковій або повній денатурації ДНК антигену *S. cerevisiae*. Фагоцитарне число (середня кількість *S. cerevisiae* в нейтрофілі) і кількість активних фагоцитів, які захопили хоча б одну клітину, не відрізнялися від контролю, але індекс травлення значно підвищувався.

Введення експериментальним тваринам сироватки крові хворих на ПКС сповільнювало адгезію, поглинання нейтрофілами гранулоцитів антигенів та їх перетравлення при збільшенні кількості здатних до фагоцитозу нейтрофілів ($5,77 \pm 1,9 \cdot 10^9$ проти $3,27 \pm 0,49 \cdot 10^9$ у контролі).

Середня кількість поглинутих клітин (*S. cerevisiae*) одним фагоцитом (фагоцитарне число) у тварин, яким вводили сироватку крові хворих на ПКС, була на 50% меншою порівняно з контролем. Індекс перетравлення поглинутих клітин у тварин, яким вводили сироватку крові хворих на ПКС, був знижений у 2,5 рази порівняно з контролем, а кількість активних фагоцитів була на 2,2 рази меншою, ніж у контрольній групі.

Профілактичне введення субстанції МФ тваринам призводило до значного підвищення фагоцитарного індексу та фагоцитарного числа до рівня контролю. Денатурація антигену зросла порівняно з тваринами з групи, яким вводили лише сироватку ПКС. Таким чином, субстанція МФ стимулювала поглинальну та перетравну здатність фагоцитів, підвищуючи

ефективність денатурації ДНК антигенних клітин у гранулоцитарних нейтрофілах у дослідних тваринах. [8]

1.3. Вплив цитотоксичних екзогенних факторів на організм, зміна фізіологічних параметрів (вага, температура, поведінкові механізми)

Після введення сироватки крові хворих на ПКС під дією антигенного вантажу у експериментальних тварин спостерігали зміну деяких фізіологічних показників: підвищення температури тіла на 1,5–2,5°, втрату маси тіла та незначну діарею. [8]

1.4. Про біологічно-активну субстанцію Міксфактор

Композитна субстанція «Міксфактор» представляє собою біологічно активний комплекс, і була розроблена в Науково-дослідному інституті біології ХНУ ім. В. Н. Каразіна. До складу «Міксфактора» входять різні біологічно активні компоненти – такі як вітаміни, нуклеотиди, ферменти, олігопептиди та амінокислоти. «Міксфактор» є багатофункціональним засобом, що має широкий спектр потенційних напрямків практичного застосування. Одним з аспектів, для яких призначений «Міксфактор» є імунокорекція. Так, на експериментальній моделі щурів з індукованим запальним процесом була показаний позитивний ефект «Міксфактора» щодо імунокоригуючої дії.

Дослідження проводили на тваринах для вивчення первинної клітинної ланки імунітету, зокрема кисневонезалежного фагоцитозу. У контрольних тварин спостерігали спроможність фагоцитів перетравлювати здібності, що відповідало нормі у молодих ($1,45 \pm 0,06$ %) та у тварин старшої групи ($1,14 \pm 0,02$ %). Після запального процесу, індукованого внутрішньочеревинним введенням суспензії *Escherichia coli*, виявлені відмінності в активності фагоцитуючих клітин у тварин різного віку. У

молодих і старших тварин спостерігалось зниження перетравлювальної функції гранулоцитарних нейтрофілів. При цьому інтенсивність ферментативної активності у молодих контрольних тварин перевищувала показники старших тварин.

Після введення антигену *E. coli* у тварин різного віку індекс стимуляції знизився порівняно з контролем. У молодих тварин концентрація С3 фрагмента комплементу була вища, ніж у старших. Після введення *E. coli* концентрація С3 фрагмента комплементу зростала, особливо в старших тварин.

Застосування імунокоригуючого препарату сприяло підвищенню показників клітинного та гуморального імунітету на тлі запалення, зокрема збільшенню індексу завершеності фагоцитозу та активності фагоцитів. Таким чином, використання композитного препарату міксфактора активувало імунну систему та покращило її функціональність, зокрема у старших тварин, де спостерігалася імунна депресія. [11]

РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ

Дослідження складалось з двох етапів: на першому етапі проводили оцінку клітинних та сироваткових імунологічних показників у пацієнтів, які перебували на лікуванні в ДУ «Інститут загальної та невідкладної хірургії НАМН України», з невідкладною хірургічною патологією на тлі постковідного синдрому (ПКС).

На другому етапі проводили 3-х кратну імунізацію лабораторних тварин у черевну порожнину сироваткою крові пацієнтів з ПКС. Тварини 4-х місячні самці щурів *Wistar* ($n = 15$) із середньою вагою 220 г були розділені на 5 груп: 1 група – інтактні тварини; 2 група - тварини, імунізовані сироваткою пацієнтів з високим вмістом олігопептидної фракції ($\lambda=238$ нм); 3 група - тварини, імунізовані сироваткою пацієнтів з високим вмістом нуклеотидної фракції ($\lambda=260$ нм); 4 група - тварини, імунізовані сироваткою пацієнтів з високим вмістом олігопептидної фракції ($\lambda=238$ нм) та яким давали імуномодулюючу субстанцію МіксФактор; 5 група - тварини, імунізовані сироваткою пацієнтів з високим вмістом нуклеотидної фракції ($\lambda=260$ нм) та яким давали імуномодулюючу субстанцію МіксФактор.

Всі тварини утримувались в стандартних умовах віварію та мали вільний доступ до їжі та води. Маніпуляції та виведення тварин з експерименту проводили з дотриманням міжнародних біоетичних норм.

2.1. Кількісний аналіз імунокомпетентних клітин.

Цитометрично визначали абсолютний вміст лейкоцитів, лімфоцитів, моноцитів, гранулоцитів і нейтрофілів. Кров відбирали в пробірки з КЗ ЕДТА (3-заміщена калієва сіль етилендіамінтетраоцтової кислоти) для подальшого дослідження гематологічних показників на автоматичному аналізаторі *Mindray BC-2800 Vet* (США).

2.2. Метод визначення фагоцитарної активності нейтрофілів периферичної крові.

Киснево-незалежний фагоцитоз визначали за ступенем поглинання та адгезії антигенів (*Saccharomyces cerevisiae*) нейтрофілами; ефективність фагоцитозу оцінювали за здатністю нейтрофілів до перетравлення – індексом завершення фагоцитозу. Визначали фагоцитарний індекс (ФІ) – відсоток клітин, що вступили у фагоцитоз, від загального їх числа, кількість нейтрофілів, та фагоцитарне число (ФЧ) – середня кількість бактерій, що знаходяться внутрішньоклітинно (частка від ділення загальної кількості поглинених бактерій на число клітин, що вступили у фагоцитоз).

Ендоцитоз зразка оцінювали через 120 хв. Обидва показники (ФІ, ФЧ) підраховують на мазках, зроблених після 30-хвилинної, а ФЧ та 90-хвилинної (тобто загалом 120-хвилинної) інкубації (ФІ 30, ФІ 120 і ФЧ 30, ФЧ 120). Індекс завершеності фагоцитозу розраховували в умовних одиницях за відношенням:

$$ІЗФ = \frac{ФЧ\ 30}{ФЧ\ 120}$$

Де *ІЗФ*- індекс завершеності фагоцитозу;

ФЧ30 – фагоцитарне число, середня кількість бактерій, що знаходяться внутрішньоклітинно, підраховано після 30 хвилин інкубації;

ФЧ120 – фагоцитарне число, середня кількість бактерій, що знаходяться внутрішньоклітинно, підраховано після 120 хвилин інкубації.

У цьому методі використовували світлову мікроскопію (*Olympus BX53*, Японія). [13]

2.3. Визначення цитотоксичності з використанням одноклітинної водорості *dunaliella viridis*.

Сукупність цитотоксичних компонентів *DAMPs* у сироватці крові визначали методом світлової мікроскопії з біоіндикатором *D. viridis* віком 18-21 день, яка була підготовлена у живильному сольовому середовищі Арторі, для оцінки їх впливу на життєздатність клітин.

Для підготовки суспензії одноклітинної водорості використовували культуру з концентрацією 2-10 клітин/мл. Після центрифугування та видалення надлишкової рідини отримували осад клітин, який розбавляли до потрібної концентрації за необхідності.

Для визначення цитотоксичності сироватки крові пацієнта клітинам *D. viridis*, використовували оцінку морфології та функціональних характеристик клітин, такі як рухливість, наявність джгутика, виділення екзометаболітів, а також утворення агрегатів. Результати оцінки дозволяли розрахувати індекс цитотоксичності сироватки ($K_{ц}$) за формулою, яка враховувала різні параметри клітинного відгуку на дію сироватки:

$$K_{ц} = \left(\frac{M_{с} + \Phi_{с} + A_{с}}{3} - K_{сп} \right) \times \frac{1}{K_{сп}}$$

Де $K_{ц}$ – коефіцієнт цитотоксичності,

$M_{с}$ - відсоток клітин із зміненою формою в досліді,

$\Phi_{с}$ - відсоток клітин із зміненими функціональними властивостями у досліді,

$A_{с}$ - відсоток агрегованих клітин у досвіді,

$K_{сп}$ - коефіцієнт спонтанної цитотоксичності.

Отримані результати порівнювали зі спонтанним рівнем цитотоксичності, розрахованим за формулою:

$$K_{\text{сп}} = \frac{M_{\text{к}} + \Phi_{\text{к}} + A_{\text{к}}}{3},$$

Де $K_{\text{сп}}$ - коефіцієнт спонтанної цитотоксичності,

$M_{\text{к}}$ - відсоток клітин зі зміненою формою у контрольній тест-системі,

$\Phi_{\text{к}}$ - відсоток клітин зі зміненими функціональними властивостями у контрольній тест-системі,

$A_{\text{к}}$ - відсоток агрегованих клітин у контрольній тест-системі.

Що дозволяло зробити висновки про токсичний вплив сироватки на клітини *D. viridis*. Наявність значної різниці між індукованим та спонтанним рівнями цитотоксичності свідчила про наявність токсичних компонентів у сироватці, що можуть впливати на клітини водорості та вказувати на патологічні процеси в організмі пацієнтів. [15]

2.4. Визначення концентрації циркулюючих імунних комплексів.

Концентрацію циркулюючих імунних комплексів (ЦІК) вимірювали спектрофотометрично за допомогою спектрофотометра *Shimadzu UV-2600* (Японія). Дослідження проводилося на основі результатів взаємодії антигенів, антитіл та білків системи комплементу після їх осадження в поліетиленгліколі з молекулярною масою 6000 при кімнатній температурі. Оптичну щільність зразків вимірювали при довжині хвилі 450 нм в порівнянні з боратним буфером. [12]

2.5. Визначення лімфцитотоксичності компонентів сироватки крові (тест Терасакі).

Визначення цитотоксичності компонентів сироватки крові проводиться в системі *in vitro*, Процедура полягає у визначенні ступеня деградації клітинних мембран аутолімфоцитів після дії аутосироватки (сироватка, отримана з того самого організму) в присутності екзогенного комплекменту. Для цього спочатку лімфоцити виділяють з крові за допомогою градієнта щільності фікол-верографіну, який розділяє різні клітинні фракції за щільністю. Далі лімфоцити інкубують з аутосироваткою при 37°C протягом 30 хвилин. Після інкубації проводять фарбування препаратів та аналіз за допомогою світлової мікроскопії. В результаті аналізу розраховують співвідношення живих інтактних клітин до мертвих клітин із зруйнованою мембраною. [14]

2.6. Визначення цитотоксичних компонентів сироватки крові DAMP.

Концентрації різних фракцій *DAMP* визначали спектрофотометричним методом (СФ-46).

До 1 мл сироватки крові додавали 500 мкл 10%-го розчину трихлороцтової кислоти, потім центрифугували впродовж 30 хвилин при 3000 об/хв.

Після центрифугування з проб відбирали по 500 мкл супернатанту та переносили в окрему пробірку. Додавали 4,5 мл дистильованої води, і визначали оптичну густина отриманих зразків.

За довжини хвилі 238 нм визначали олігопептидну фракцію, 254 нм – пептидну, 260 нм – нуклеотидну, 280 нм – фракція ароматичних амінокислот. Результати оцінювали в умовних одиницях оптичної густини (од. Е).

2.7. Статистичні методи аналізу.

Дані представлені як середнє (\bar{x}) і помилка середнього (SE).

Статистичний аналіз проводили за допомогою програми *Microsoft Office Excel 2021* (США).

РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ І ОБГОВОРЕННЯ

Після введення сироватки крові пацієнтів, у тварин спостерігали зміну деяких фізіологічних показників: підвищення температури тіла на 1–1,5°, втрату маси тіла після кожної імунізації та незначну діарею. У експериментальних тварин 2 групи, порівняно з контролем, спостерігається збільшення кількості лімфоцитів на 12%, зменшення гранулоцитів та моноцитів — на 35% та 53% відсотка відповідно, а додавання МФ спровокувало зменшення лімфоцитів, моноцитів та гранулоцитів на 18%, 71% та 63% відповідно. У 3 групі спостерігається зменшення лімфоцитів, моноцитів та гранулоцитів на 36%, 43% та 43% відповідно. Пероральне двократне введення МФ достовірно не мало сильного впливу на результати (Табл. 3).

Таблиця 3.

Гематологічні показники дослідних тварин: Групи тварин: 1 – інтактні тварини; 2 – тварини, імунізовані сироваткою пацієнтів з високим вмістом олігопептидної фракції ($\lambda=238$ нм); 3 – тварини, імунізовані сироваткою пацієнтів з високим вмістом нуклеотидної фракції ($\lambda=260$ нм); 4 – тварини, імунізовані сироваткою пацієнтів з високим вмістом олігопептидної фракції ($\lambda=238$ нм) + МФ; 5 – тварини, імунізовані сироваткою пацієнтів з високим вмістом нуклеотидної фракції ($\lambda=260$ нм) + МФ.

Параметри\група	1	2	3	4	5
Lymphocytes *10 ⁹ /L	13,23	14,83	8,47	10,80	8,05
Monocytes *10 ⁹ /L	1,40	0,90	0,80	0,40	0,75
Granulocytes *10 ⁹ /L	6,60	3,10	3,73	2,43	3,50

Отже, компоненти сироватки крові хворих індукували пригнічення проліферації та диференціації імунокомпетентних клітин у щурів. Найбільш негативний вплив мала сироватка крові пацієнтів з високим вмістом цитотоксичних нуклеотидних фракцій *DAMP*, а введення МФ практично не впливало на цей процес.

3.1. Вплив компонентів сироватки крові хворих на вміст циркулюючих імунних комплексів (ЦК) після їх введення експериментальним тваринам.

Циркулюючі імунні комплекси (ЦК) - це комплекси антитіла та антигену, які циркулюють у крові. Ці комплекси утворюються внаслідок взаємодії антитіл з антигенами, таким чином, що антитіла зв'язуються з антигенами та утворюють стійкі комплекси та мають важливе значення для захисту організму від інфекцій та інших шкідливих впливів.

Для тварин з нормальним мікробним навантаженням у звичайних умовах кількість ЦК у нормі складає 200 одиниць. Коли експериментальним тваринам ввели сироватку з високим вмістом олігопептидної фракції (2 група), нейтралізуючий ефект антитіла знизився з норми (200) до 43. Імунізацію сироваткою з високим вмістом нуклеотидної фракції (3 група) знижувало утворення комплексів антитіло-антиген на тому ж рівні, що й у 2 групи.

Введення 4 та 5 групам тварин після третьої імунізації поліфункціонального препарату МФ достовірно збільшувало процес антитілоутворення і формування ЦК у 1,5 та 2 рази порівняно з 2 та 3 групами відповідно.

Після імунізації спостерігали зниження антитілозалежної опсонізації антигенів. Введення МФ після імунізації сприяло збільшенню ЦКів як для

тварин, яким вводили сироватку з високим вмістом олігопептидної фракції, так і сироватки з високим вмістом нуклеотидної фракції, тобто, МФ стимулював пригнічений процес утворення імунних комплексів (Рис.3.1)

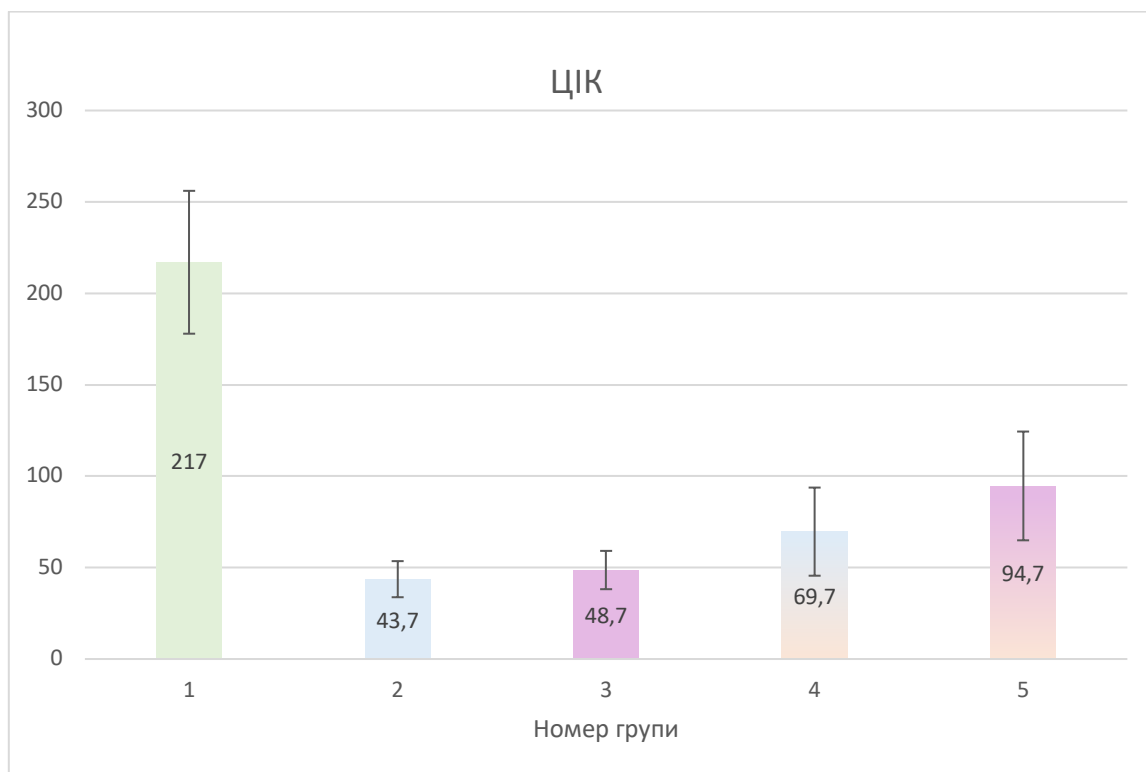


Рис. 3.1. Вміст циркулюючих імунних комплексів у крові щурів. Групи тварин: 1 – інтактні тварини; 2 – тварини, імунізовані сироваткою пацієнтів з високим вмістом олігопептидної фракції ($\lambda=238$ нм); 3 – тварини, імунізовані сироваткою пацієнтів з високим вмістом нуклеотидної фракції ($\lambda=260$ нм); 4 – тварини, імунізовані сироваткою пацієнтів з високим вмістом олігопептидної фракції ($\lambda=238$ нм) + МФ; 5 – тварини, імунізовані сироваткою пацієнтів з високим вмістом нуклеотидної фракції ($\lambda=260$ нм) + МФ. Наведено середні значення та стандартні помилки ($x \pm SE$) для 3 тварин у кожній групі.

3.2. Ступінь ураження мембран лімфоцитів у тесті Терасакі аутосироваткою експериментальних тварин.

Тест Терасакі є методом для оцінки рівня цитотоксичності компонентів сироватки крові в імунологічних дослідженнях. Наявність цитотоксичних компонентів у сироватці крові тварин після імунізації оцінювали за ступенем руйнування клітинних мембран лімфоцитів за дією аутоантитіл у присутності комплекменту *in vitro*. В класичному тесті на лімфоцитотоксичність введення цитотоксичної олігонуклеотидної фракції *DAMP* збільшує цитотоксичні властивості сироватки імунізованих експериментальних тварин у 1,5 рази порівняно з контролем, а введення цитотоксичної нуклеотидної фракції *DAMP* збільшує цитотоксичні властивості у 1,7 разів.

Достовірних змін у кількості клітин із зруйнованою мембраною після перорального введення біологічно активної субстанції МФ тваринам 4 групи не спостерігалось. Водночас цитотоксичний ефект сироватки крові тварин, імунізованих сироваткою пацієнтів з високим вмістом нуклеотидної фракції (5 група) дещо коригувався та зменшував показники з 60,3% токсичності до майже рівня контролю – 39% (Рис. 3.2).

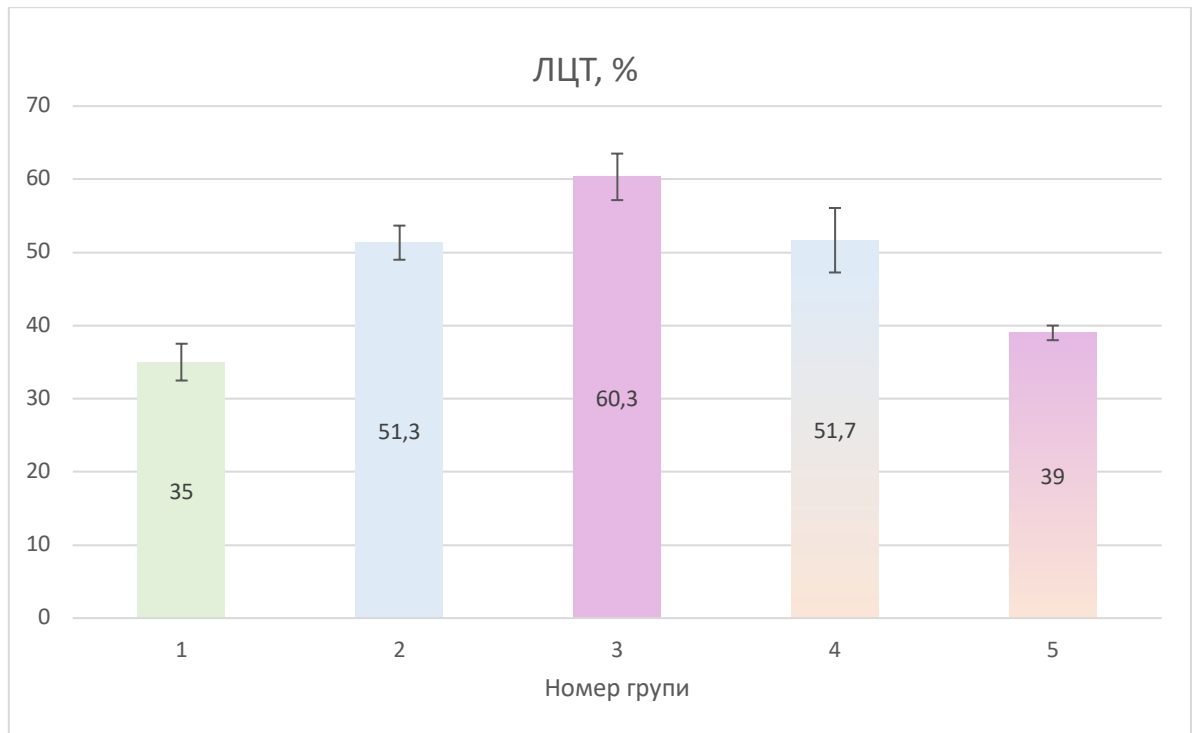


Рис. 3.2. Цитотоксичність сироватки крові щурів. Групи тварин: 1 – інтактні тварини; 2 – тварини, імунізовані сироваткою пацієнтів з високим вмістом олігопептидної фракції ($\lambda=238$ нм); 3 – тварини, імунізовані сироваткою пацієнтів з високим вмістом нуклеотидної фракції ($\lambda=260$ нм); 4 – тварини, імунізовані сироваткою пацієнтів з високим вмістом олігопептидної фракції ($\lambda=238$ нм) + МФ; 5 – тварини, імунізовані сироваткою пацієнтів з високим вмістом нуклеотидної фракції ($\lambda=260$ нм) + МФ. Наведено середні значення та стандартні помилки ($x \pm SE$) для 3 тварин у кожній групі.

3.3. Вплив цитотоксичних фракцій сироватки крові на тест культуру *D. Viridis*.

D. Viridis одноклітинна тест-культура, не має клітинної стінки, що робить їх схожими на клітини тварин, а рецептори на їх клітинній стінці здатні сприймати весь набір компонентів сироватки, що робить їх гарними реєстраторами змін у навколишньому середовищі.

Виявилось, що інтегральний коефіцієнт цитотоксичності, після додавання сироватки крові тварин, які отримували сироватку крові хворих з підвищеним вмістом олігопептидної фракції (2 група), збільшувався до 6,3 порівняно з 3,1 контрольної групи, а додавання МФ (4 група) не впливало ніяким чином на ситуацію. У 3 групі ситуація дещо краща – 3,6, порівняно з 2 групою, але введення МФ (5 група) погіршило ситуацію та збільшило коефіцієнт цитотоксичності до 6,4 (Рис.3.3).

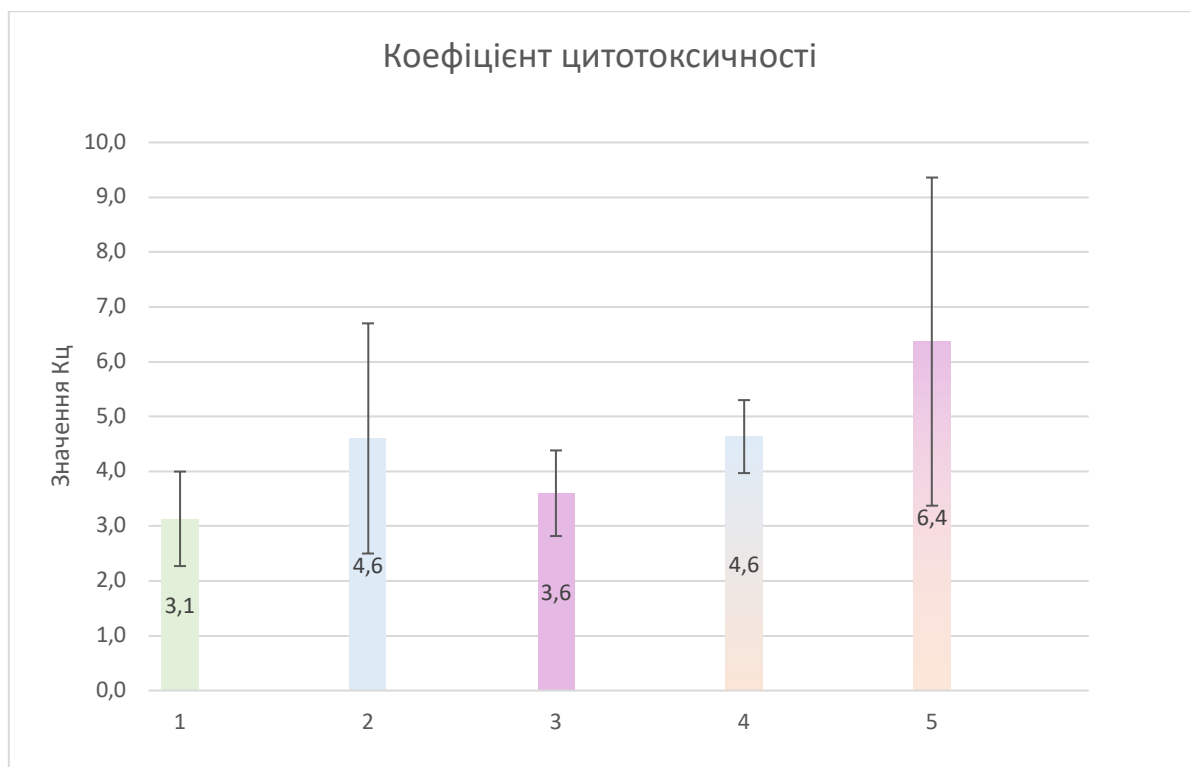


Рис. 3.3. Коефіцієнт цитотоксичності у тесті з одноклітинною водоростю *D. Viridis*. Групи тварин: 1 – інтактні тварини; 2 – тварини, імунізовані сироваткою пацієнтів з високим вмістом олігопептидної фракції ($\lambda=238$ нм); 3 – тварини, імунізовані сироваткою пацієнтів з високим вмістом нуклеотидної фракції ($\lambda=260$ нм); 4 – тварини, імунізовані сироваткою пацієнтів з високим вмістом олігопептидної фракції ($\lambda=238$ нм) + МФ; 5 – тварини, імунізовані сироваткою пацієнтів з високим вмістом нуклеотидної фракції ($\lambda=260$ нм) + МФ. Наведено середні значення та стандартні помилки ($\bar{x} \pm SE$) для 3 тварин у кожній групі.

3.4. Вплив цитотоксичних фракцій сироватки крові хворих *DAMP* на фагоцитарну активність нейтрофілів периферичної крові експериментальних тварин.

У тварин, яким вводили сироватку пацієнтів з високим вмістом олігопептидної фракції, збільшувалася кількість клітин, які вступили в фагоцитоз. Фагоцитарне число (середня кількість *S. cerevisiae* в нейтрофілі) і кількість активних фагоцитів, що захопили хоча б одну клітину, незначно збільшилось порівняно з контролем, але індекс завершеності фагоцитозу залишився на рівні контролю. Додавання МФ зменшувало як фагоцитарний індекс, число, так і індекс завершеності до 71.7, 3.6, 1.1 відповідно.

Введення сироватки крові хворих з високим вмістом нуклеотидної фракції експериментальним тваринам інгібувало адгезію, поглинання антигенів гранулоцитарними нейтрофілами та їх перетравлення. Середня кількість поглинутих клітин (*S. cerevisiae*) на один фагоцит (фагоцитарне число) у тварин була 65,7% порівняно з 73,7% показником контрольної групи. Індекс перетравлювання абсорбованих клітин у тварин, яким вводили сироватку крові хворих з високим вмістом нуклеотидної фракції, була знижена в 2 рази порівняно з контролем, а кількість активних фагоцитів була менша за контроль – 65,7% проти 73,7%.

Введення субстанції МФ та сироваткою з великим вмістом нуклеотидної фракції тваринам (5 група) призводило до підвищення фагоцитарного індексу та фагоцитарного числа майже до контрольного рівня (1 група), та покращувало результати порівняно з 3 групою. Індекс завершеності піднявся до показника 1,2 проти 0,8 третьої групи, фагоцитарне число залишилось на одному рівні з 3 групою, а число клітин, що вступили у фагоцитоз, збільшилось до 75,3 %. Отже, речовина МФ стимулювала поглинальну та перетравлюючу здатність фагоцитів, підвищуючи ефективність денатурації ДНК антигенних клітин у гранулоцитарних нейтрофілах у 2-й та 4-й групах експериментальних тварин. (Табл. 3.4.)

Таблиця 3.4.

Показники гуморальної ланки імунітету – кисневонезалежного фагоцитозу: Групи тварин: 1 – інтактні тварини; 2 – тварини, імунізовані сироваткою пацієнтів з високим вмістом олігопептидної фракції ($\lambda=238$ нм); 3 – тварини, імунізовані сироваткою пацієнтів з високим вмістом нуклеотидної фракції ($\lambda=260$ нм); 4 – тварини, імунізовані сироваткою пацієнтів з високим вмістом олігопептидної фракції ($\lambda=238$ нм) + МФ; 5 – тварини, імунізовані сироваткою пацієнтів з високим вмістом нуклеотидної фракції ($\lambda=260$ нм) + МФ.

Група тварин	ФІ	ФЧ	ІЗФ
Інтактні тварини	73,7 ± 4,2	3,8 ± 0,7	1,7 ± 0,3
Тварини, імунізовані сироваткою пацієнтів з високим вмістом олігопептидної фракції ($\lambda=238$ нм)	77,0 ± 5	4,9 ± 0,6	1,7 ± 0,5
Тварини, імунізовані сироваткою пацієнтів з високим вмістом нуклеотидної фракції ($\lambda=260$ нм)	65,7 ± 8,1	3,8 ± 1,1	0,8 ± 0,2
Тварини, імунізовані сироваткою пацієнтів з високим вмістом олігопептидної фракції ($\lambda=238$ нм) + МФ	71,7 ± 6,5	3,6 ± 0,9	1,1 ± 0,3
Тварини, імунізовані сироваткою пацієнтів з високим вмістом нуклеотидної фракції ($\lambda=260$ нм) + МФ	75,3 ± 9,1	3,6 ± 0,3	1,2 ± 0,5

3.5. Обговорення

Як відомо, першим бар'єром на шляху вірусу до організму стоїть вроджений імунітет, гуморальні та клітинні фактори якого виконують провідну роль у формуванні адаптивної стратегії організму. Важливо відзначити, що при вірусній інфекції білки вірусу взаємодіють з білками системи комплементу, а оскільки останні мають протеазну активність, то за відсутності специфічних інгібіторів вони призводять до руйнування клітинних мембран [8]. Це може спричинити утворення DAMP, що підтверджується підвищенням цитотоксичності в тесті Терасакі, як було показано у цій роботі, що в свою чергу створює замкнуте коло і симптоми ПКС.

Усі методи дослідження виявили достовірну відповідь системи імунітету тварин на сироватку крові пацієнтів з високим вмістом різних фракцій DAMP, що мають прояви ПКС. Цей факт доводить відсутність їхньої специфічної дії та дає змогу моделювати ефекти після COVID-19 на експериментальних тваринах, а також може слугувати непрямим підтвердженням того, що DAMP «здатні» запускати каскад метаболічних процесів, які підсилюють їх цитотоксичну дію.

Було доведено, що основним патогенетичним фактором, що викликає симптоми ПКС у людей та у тварин, яких імунізували сироваткою крові людей, що мають прояви ПКС, є наявність фракцій DAMPs. Враховуючи всі методи дослідження, використані у цій роботі, можна впевнено сказати, що саме олігонуклеотидна фракція викликає найбільший відгук системи імунітету, оскільки виражений патофізіологічний ефект спостерігається у тих тварин, яких імунізували сироваткою крові пацієнтів, що мають прояви ПКС, з підвищеним вмістом олігонуклеотидної фракції.

Біологічна субстанція МФ має виражену імунотропну дію, яка проявляється в стимуляції перетравлюючої здібності нейтрофілів, утворенні імунних комплексів АТ-АГ для олігопептидної та нуклеотидної фракцій у

1,5 та 2 рази відповідно. Також ми спостерігали цілком очікувану відповідь одноклітинної водості *D. Viridis* як збільшенням кількості морфологічно і функціонально змінених клітин, так і утворенням агрегатів на МіксФактор, що можна пояснити наступним: МФ може стимулювати активацію системи комплемента, зокрема фрагменти C3 і C4, що може призводити до утворення мембрано-атакуючого комплексу, який пошкоджує клітини мікрородості. Біологічна субстанція підвищує афінність антитіл до антигенів, що сприяє формуванню більшої кількості імунних комплексів (АГ-АТ), які можуть бути цитотоксичними для клітин мікрородості.

МФ стимулював число клітин, що вступили у фагоцитоз та поглинаючу здібність нейтрофілів у тварин, яких імунізували нуклеотидною фракцією головним чином за рахунок стимуляції рецепторів фагоцитуючих клітин, таких як Toll-подібні рецептори (TLR), що призводить до підвищення активності цих клітин. МФ може підвищувати адгезивні властивості фагоцитуючих клітин, що полегшує захоплення та утримання патогенів або інших часток, які потрібно фагоцитувати, та сприяти збільшенню кількості опсонінів, таких як антитіла або компонентів комплементу – фрагментів C3b та C4b, що покращує розпізнавання патогенів фагоцитуючими клітинами.

У дослідженнях раніше [42-44] було продемонстровано, що МФ нормалізує патологічно змінену функцію печінки. У іншому дослідженні [8] попереднє введення субстанції МФ викликало збільшення у крові в 2,2 рази вмісту моноцитів і меншою мірою (на 60%) гранулоцитів. Тому сумнівів, що МФ покращить імунометаболічні характеристики та «намалює» нову імунометаболічну «картину» в організмі не залишилось. Цитотоксичні компоненти сироватки крові хворих на ПКС, які вводяться в модельний організм, значно швидше інактивуються та виводяться з організму під дією біологічної субстанції.

ВИСНОВКИ

Було проведено оцінку імунотропної дії біологічної субстанції МіхFactor на експериментальних тваринах за показниками:

- клітинного імунітету - кисневонезалежного фагоцитозу;
- гуморального імунітету: цитотоксичності та лімфоцитоксичності компонентів сироватки;
- зміни концентрації циркулюючих імунних комплексів

та зроблено такі висновки:

- 1) Реакція клітинної ланки вродженого імунітету: найменший фагоцитарний індекс (поглинальна спроможність нейтрофілів) був у тварин, імунізованих сироваткою з нуклеотидною фракцією (3 група). Завдяки МФ у цих тварин збільшилася кількість нейтрофільних гранулоцитів, що вступили у фагоцитоз, з 65,7% до 75,3%. Перетравлювальна здібність (ІЗФ) була знижена (0,8) у цієї ж 3ї групи тварин. Введення МФ нормалізувало ІЗФ до референтних значень (1,1-1,2) у випадку введенням тваринам (групи 4 та 5).
- 2) Реакція гуморальної ланки: введення МФ призводило до збільшення цитотоксичності при вимірюванні за допомогою *D. Viridis* ймовірно через афінитет при взаємодії АТ-АГ, що призводить до утворення мембрано-атакуючого комплексу, який пошкоджує клітини мікроводорості. Імунізація тварин нуклеотидною фракцією збільшує кількість уражених мембран майже у 2 рази, порівняно з контролем, проте МіксФактор знижує значення лімфоцитотоксичності до рівня контролю.
- 3) Кількість ЦК після введення МФ зростає, оскільки відбувається активація С3 і С4 фрагментів системи комплемента, що є плюсом через більшу ефективність ілюмінації *DAMPs*. МФ активує адгезивні

властивості та опонізуючу здатність антитіл та білків комплемента, що сприяє збільшенню утворення ЦІК.

Результати цього дослідження можуть зробити важливий внесок у розуміння механізмів захисту організму після перенесеної інфекції *SARS-CoV-2* та сприяти подальшому розвитку стратегій для подолання симптомів ПКС.

ВИКОРИСТАНА ЛІТЕРАТУРА

1. Nicholson L. B. The immune system // *Essays in Biochemistry*. 2016. Vol. 60, no. 3. P. 275–301. URL: <https://doi.org/10.1042/ebc20160017> (date of access: 20.05.2024).
2. Ivan M. Roitt, Dennis R. Burton, Peter J. Delves, Seamus J. Martin. *Essential Immunology*, Thirteenth edition. 2017. p 3-15
3. Marshall J. S., Warrington R., Watson W., Kim H. L. An introduction to immunology and immunopathology // *Allergy Asthma Clin Immunol*. 2018. Vol. 14, S2. doi: 10.1186/s13223-018-0278-1 (date of access: 20.05.2024).
4. Mollah F., Tam S. Complement Deficiency // *StatPearls [Internet]*. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2024 Jan. URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK557581/> (date of access: 20.05.2024).
5. Sarma J. V., Ward P. A. The complement system // *Cell Tissue Res*. 2011. Vol. 343, no. 1. P. 227-235. doi: 10.1007/s00441-010-1034-0.
6. Afzali B., Noris M., Lambrecht B. N. et al. The state of complement in COVID-19 // *Nat Rev Immunol*. 2022. Vol. 22. P. 77–84. URL: <https://doi.org/10.1038/s41577-021-00665-1>.
7. Klimova E. M., Bozhkov A. I., Lavinska O. V., Drozdova L. A., Kurhuzova N. I. Low molecular weight cytotoxic components (DAMPs) form the post-COVID-19 syndrome // *Immunobiology*. 2023. Vol. 228, no. 1. Article 152316. doi: <https://doi.org/10.1016/j.imbio.2022.152316>.
8. Chippa V., Aleem A., Anjum F. Post-Acute Coronavirus (COVID-19) Syndrome // *StatPearls [Internet]*. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2024 Jan. URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK570608/> (date of access: 20.05.2024).
9. Parthasarathy U., Martinelli R., Vollmann E. H., Best K., Therien A. G. The impact of DAMP-mediated inflammation in severe COVID-19 and

- related disorders // *Biochem Pharmacol.* 2022. Vol. 195. Article 114847. doi: 10.1016/j.bcp.2021.114847.
10. Спосіб імунокорекції бактеріального запального процесу: пат. 117986 Україна. № U201702855; заявл. 27.03.2017 ; опубл.10.07.2017, Бюл. № 13.
11. Riha I., Haskova V., Kaslik J., Maierova M., Stransky J. The use of polyethylene glycol for immune complex detection in human sera // *Mol. Immunol.* 1979. Vol. 16. P. 489-493. doi: 10.1016/0161-5890(79)90075-0.
12. Terasaki P., McClelland J. Microdroplet assay of human serum cytotoxins // *Nature.* 1964. Vol. 204. P. 998-1000. doi: 10.1038/204998b0.
13. Klimova E. M., Bozhkov A. I., Boyko V. V., Drozdova L. A., Lavinskaya E. V., Skok M. V. Endogenic cytotoxic compounds and formation of the clinic forms of myasthenia // *Transl. Biomed.* 2016. Vol. 7, no. 3. P. 1-13. doi: 10.21767/2172-0479.100084.
14. Bartolini D., Stabile A. M., Bastianelli S., Giustarini D., Pierucci S., Busti C., Vacca C., Gidari A., Francisci D., Castronari R., Mencacci A., Di Cristina M., Focaia R., Sabbatini S., Rende M., Gioiello A., Cruciani G., Rossi R., Galli F. SARS-CoV2 infection impairs the metabolism and redox function of cellular glutathione // *Redox Biol.* 2021. Article 102041. doi: 10.1016/j.redox.2021.102041.
15. Boix V., Merino E. Síndrome post-COVID. El desafío continúa // *Med Clin (Barc).* 2022. Vol. 158, P. 178-180. doi: 10.1016/j.medcli.2021.10.002.
16. Carvalho-Schneider C., Laurent E., Lemaigen A., Beaufils E., Bourbao-Tournois C., Laribi S., Flament T., Ferreira-Maldent N., Bruyère F., Stefic K., Gaudy-Graffin C., Grammatico-Guillon L., Bernard L. Follow-up of adults with noncritical COVID-19 two months after symptom onset // *Clin. Microbiol. Infect.* 2020. Vol. 27, no. 2, P. 258-263. doi: 10.1016/j.cmi.2020.09.052.
17. Coperchini F., Chiovato L., Croce L., Magri F., Rotondi M. The cytokine storm in COVID-19: An overview of the involvement of the

- chemokine/chemokine-receptor system // *Cytokine Growth Factor Rev.* 2020. Vol. 53, P. 25-32. doi: 10.1016/j.cytogfr.2020.05.003.
18. Da Rosa Mesquita R., Francelino Silva Junior L. C., Santos Santana F. M., de Oliveira T. F., Alcântara R. C., Arnozo G. M., da Silva Filho E. R., dos Santos A. G. G., da Cunha E. J. O., de Aquino S. H. S., de Souza C. D. F. Clinical manifestations of COVID-19 in the general population: systematic review // *Wien. Klin. Wochenschr.* 2021. Vol. 133, P. 377-382. doi: 10.1007/s00508-020-01760-4.
19. Di Martino M., García Septiem J., Maqueda González R., Muñoz de Nova J. L., de la Hoz Rodríguez Á., Correa Bonito A., Martín-Pérez E. et al. Cirugía electiva durante la pandemia por SARS-CoV-2 (COVID-19): análisis de morbimortalidad y recomendaciones sobre priorización de los pacientes y medidas de seguridad // *Cir. Esp.* 2020. Article 10.1016/j.ciresp.2020.04.029.
20. Djaharuddin I., Munawwarah S., Nurulita A., Ilyas M., Tabri N. A., Lihawa N. Comorbidities and mortality in COVID-19 patients // *Gac. Sanit.* 2021. Vol. 5, Suppl. 2, P. S530-S532. doi: 10.1016/j.gaceta.2021.10.085.
21. Forneris F., Wu J., Gros P. The modular serine proteases of the complement cascade // *Curr. Opin. Struct. Biol.* 2012. Vol. 22, no. 3, P. 333-341. doi: 10.1016/j.sbi.2012.04.001.
22. Gioia M., Ciaccio C., Calligari P., De Simone G., Sbardella D., Tundo G., Fasciglione G. F., Di Masi A., Di Pierro D., Bocedi A., Ascenzi P., Coletta M. Role of proteolytic enzymes in the COVID-19 infection and promising therapeutic approaches // *Biochem. Pharmacol.* 2020. Vol. 182, Article 114225. doi: 10.1016/j.bcp.2020.114225.
23. Gupta A., Madhavan M. V., Sehgal K., Nair N., Mahajan S., Sehrawat T. S., Bikdeli B., Ahluwalia N., Ausiello J. C., Wan E. Y., Freedberg D. E., Kirtane A. J., Parikh S. A., Maurer M. S., Nordvig A. S., Accili D., Bathon J. M., Mohan S., Bauer K. A., Leon M. B., Krumholz H. M., Uriel N., Mehra M. R., Elkind M. S. V., Stone G. W., Schwartz A., Ho D. D.,

- Bilezikian J. P., Landry D. W. Extrapulmonary manifestations of COVID-19 // *Nat. Med.* 2020. Vol. 26, no. 7, P. 1017-1032. doi: 10.1038/s41591-020-0968-3.
24. Huang C., Huang L., Wang Y., Li X., Ren L., Gu X., Kang L., Guo L., Liu M., Zhou X., Luo J., Huang Z., Tu S., Zhao Y., Chen L., Xu D., Li Y., Li C., Peng L., Li Y., Xie W., Cui D., Shang L., Fan G., Xu J., Wang G., Wang Y., Zhong J., Wang C., Wang J., Zhang D., Cao B. 6-month consequences of COVID-19 in patients discharged from hospital: a cohort study // *Lancet.* 2021. Vol. 16, P. 220-232. doi: 10.1016/S0140-6736(20)32656-8.
25. Lai C. C., Shih T. P., Ko W. C., Tang H. J., Hsueh P. R. Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) and coronavirus disease-2019 (COVID-19): The epidemic and the challenges // *Int. J. Antimicrob. Agents.* 2020. Vol. 55, no. 3, Article 105924. doi: 10.1016/j.ijantimicag.2020.105924.
26. Masjuk N. P. Morphology, systematics, ecology, geographical distribution of *Dunaliella* // *Teod Kiev. Science.* 1973. Vol. 372.
27. Nalbandian A., Sehgal K., Gupta A., Madhavan M. V., McGroder C., Stevens J. S., Cook J. R., Nordvig A. S., Shalev D., Sehrawat T. S., Ahluwalia N., Bikdeli B., Dietz D., Der-Nigoghossian C., Liyanage-Don N., Rosner G. F., Bernstein E. J., Mohan S., Beckley A. A., Seres D. S., Choueiri T. K., Uriel N., Ausiello J. C., Accili D., Freedberg D. E., Baldwin M., Schwartz A., Brodie D., Garcia C. K., Elkind M. S. V., Connors J. M., Bilezikian J. P., Landry D. W., Wan E. Y. Post-acute COVID-19 syndrome // *Nat. Med.* 2021. Vol. 27, P. 601-615. doi: 10.1038/s41591-021-01283-z.
28. Khanna N. R., Gerriets V. Interferon // *StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL), 2024 Jan. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK555932/>*
29. Dong E., Du H., Gardner L. An interactive web-based dashboard to track COVID-19 in real time // *Lancet Infect Dis.* 2020 May. doi: 10.1016/S1473-3099(20)30120-1.

30. Noris M., Remuzzi G. Overview of complement activation and regulation // *Semin Nephrol.* 2013 Nov. doi: 10.1016/j.semnephrol.2013.08.001.
31. Lo M. W., Kemper C., Woodruff T. M. COVID-19: Complement, Coagulation, and Collateral Damage // *J Immunol.* 2020. doi: 10.4049/jimmunol.2000644.
32. Li X. X., Clark R. J., Woodruff T. M. C5aR2 Activation Broadly Modulates the Signaling and Function of Primary Human Macrophages // *J Immunol.* 2020. Vol. 205, no. 4, P. 1102-1112. doi: 10.4049/jimmunol.2000407.
33. Ward P. The dark side of C5a in sepsis // *Nat Rev Immunol.* 2004. Vol. 4, P. 133-142. doi: 10.1038/nri1269.
34. Song W. J., Hui C. K. M., Hull J. H., Birring S. S., McGarvey L., Mazzone S. B., Chung K. F. Confronting COVID-19-associated cough and the post-COVID syndrome: role of viral neurotropism, neuroinflammation, and neuroimmune responses // *Lancet Respir Med.* 2021 May. doi: 10.1016/S2213-2600(21)00125-9.
35. Oronsky B., Larson C., Hammond T. C., Oronsky A., Kesari S., Lybeck M., Reid T. R. A Review of Persistent Post-COVID Syndrome (PPCS) // *Clin Rev Allergy Immunol.* 2023 Feb; Epub 2021 Feb 20. doi: 10.1007/s12016-021-08848-3.
36. Shukla A. K., Misra S. An overview of post COVID sequelae // *J Basic Clin Physiol Pharmacol.* 2022 Apr 15. doi: 10.1515/jbcpp-2022-0057.
37. Nabavi N. Long covid: How to define it and how to manage it // *BMJ.* 2020 Sep 7. doi: 10.1136/bmj.m3489.
38. Lopez-Leon S., Wegman-Ostrosky T., Perelman C., Sepulveda R., Rebolledo P. A., Cuapio A., Villapol S. More than 50 long-term effects of COVID-19: a systematic review and meta-analysis // *Sci Rep.* 2021 Aug 9. doi: 10.1038/s41598-021-95565-8.
39. A.I. Bozhkov, Y.V. Nikitchenko, E.M. Klimova, O.S. Linkevych, K.M. Lebid, A.M.M. Al-Bahadli, M.M.A. Alsardia. Young and old rats have

- different strategies of metabolic adaptation to Cu-induced liver fibrosis // Adv. Gerontol. 2017. T. 7. C. 41-50. DOI: 10.1134/S2079057017010040.
40. A.I. Bozhkov, Y.V. Nikitchenko, K.M. Lebid, E.G. Ivanov, N.I. Kurguzova, S.S. Gayevoy, M.O. Sharko, M.A. Alsardia Mohammad, A.B. Mohammad, A.y., Low molecular weight components from various sources eliminate oxidative stress and restore physiological characteristic of animals at early stages of Cu-induced liver fibrosis development // Transl. Biomed. 2017. T. 8. C. 2. DOI: 10.2167/2172-0479.1000107.
41. A.I. Bozhkov, A.A. Bozhkov, I.E. Ponomarenko, N.I. Kurguzova, R.A. Akzhyhitov, A.V. Goltvyanskii, E.M. Klimova, S.O. Shapovalov. Elimination of the toxic effect of copper sulfate is accompanied by the normalization of liver function in fibrosis // Regul. Mech. Biosyst. 2021. T. 12, № 4. C. 655-663. DOI: 10.15421/022190.