

«УТВЕРЖДАЮ»

Директор НИИ фармакологии
СО РАМН, академик РАМН

_____ М. Дыгай
« _____ 2009 г.



ОТЧЕТ

**об углубленном исследовании иммуотропных
свойств иммобилизованных олигонуклеотидов**

Ответственный исполнитель:

Рук. лаборатории иммуофармакологии
НИИ фармакологии СО РАМН,
д.м.н., профессор

Е.Ю. Шерстобоев

СПИСОК ИСПОЛНИТЕЛЕЙ

Рук. лаборатории иммунофармакологии, д.м.н., профессор



Е.Ю. Шерстобоев

Рук. отдела иммунофармакологии и биологических моделей, д.м.н., профессор



В.И. Агафонов

В.н.с., д.м.н.



Н.В. Масная

В.н.с., д.м.н.



Ю.П. Бельский

С.н.с., д.м.н.



Н.В. Бельская

С.н.с., к.б.н.



М.Г. Данилец

Н.с., к.м.н.



О.С. Борсук

М.н.с.



Е.Г. Учасова

Аспирант



А.А. Лигачева

Лаборант-исследователь



А.В. Звягина

РЕФЕРАТ

Отчет 14 с., 5 табл., 12 источников

Ключевые слова: иммобилизованные олигонуклеотиды ДНК молок лососевых, иммуностропные свойства, мыши, естественные киллерные клетки, пролиферативная активность лимфоцитов, функциональная активность макрофагов, лиганд и антагонист TLR-9

В рамках общей программы доклинического изучения проведено дополнительное экспериментальное изучение иммуностропных свойств иммобилизованных олигонуклеотидов ДНК молок лососевых (ООО «Саентифик фьючер менеджмент», Новосибирск).

Иммобилизованные олигонуклеотиды ДНК молок лососевых (им-ОГН) исследовались у мышей в дозе 10 мг/кг, которая была пересчитана, исходя из средней терапевтической дозы иммобилизованных олигонуклеотидов для человека (50 мг), и была определена как терапевтическая (1 ТД) и в дозе на порядок ее выше – 100 мг/кг (10 ТД). Экспериментальная оценка иммуностропных свойств им-ОГН проводилась в опытах на животных *in vivo* с использованием следующих тестов: изучение влияния исследуемого препарата на функциональную активность естественных киллеров, пролиферативную активность Т- и В-лимфоцитов с помощью реакции бласттрансформации, общее количество лейкоцитов в периферической крови и гемограмму. В системе *in vitro* исследовалось влияние им-ОГН на баланс макрофаг 1 (провоспалительных) и макрофаг 2 (противовоспалительных) по продукции соответственно оксида азота или аргиназы.

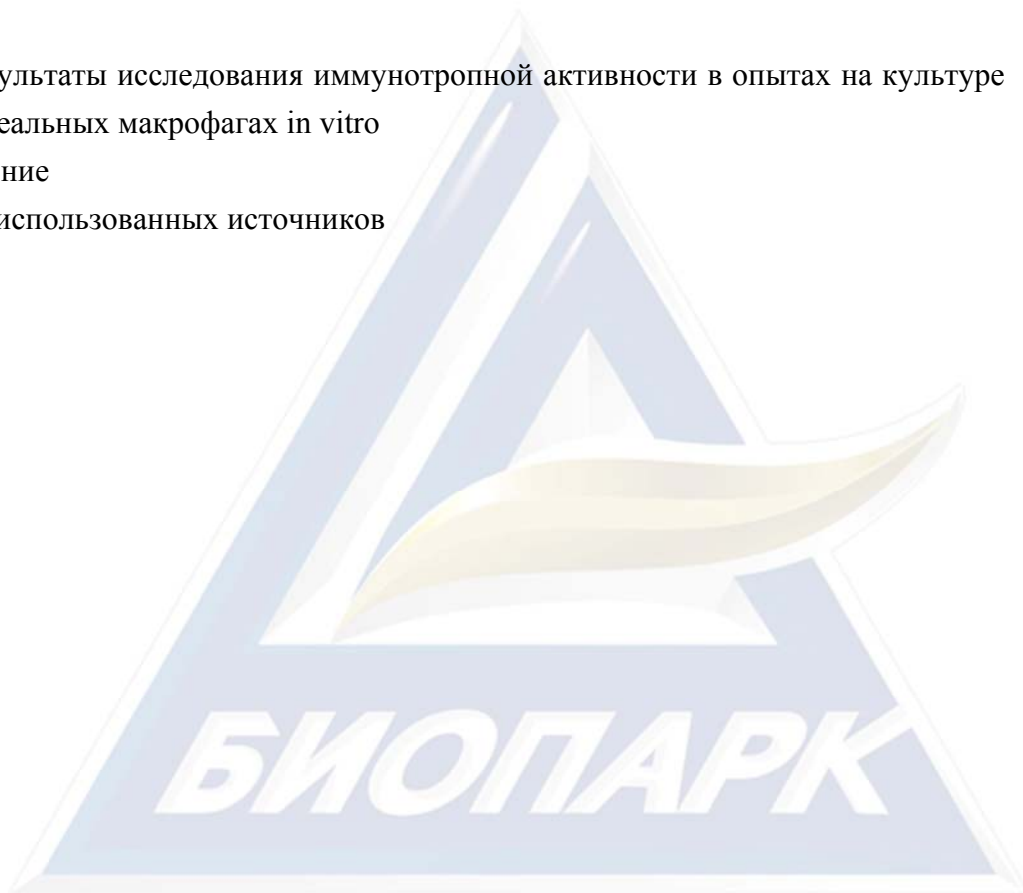
Исследование показало, что курсовое применение им-ОГН в дозе 100 мг/кг (10ТД) усиливало цитотоксическую активность естественных киллеров экспериментальных животных при всех изученных соотношениях мишеней к эффекторам (1:10, 1:25 и 1:50).

После курсового введения иммобилизованных олигонуклеотидов в терапевтической дозе (10 мг/кг) наблюдалось повышение спонтанной пролиферативной активности лимфоидных клеток экспериментальных животных. При этом индекс стимуляции В-лимфоцитов в обеих опытных группах с курсовым введением иммобилизованных олигонуклеотидов в терапевтической дозе и в дозе, на порядок ее превышающую, возрастал.

Исследуемый препарат обладал стимулирующим действием в отношении макрофаг 1 (провоспалительных), что выражалось в повышении под действием им-ОГН продукции оксида азота. Это действие опосредуется макрофагальным рецептором TLR-9.

СОДЕРЖАНИЕ

Введение	5
1. Материал и методы исследования	6-13
1.1. Материал	6
1.2. Методы оценки иммуностропной активности в опытах на животных <i>in vivo</i>	6-8
1.3. Методы оценки иммуностропной активности в опытах на культуре перитонеальных макрофагах <i>in vitro</i>	8-9
2. Результаты исследования	9-12
2.1. Результаты исследования иммуностропной активности в опытах на животных <i>in vivo</i>	9-11
2.2. Результаты исследования иммуностропной активности в опытах на культуре перитонеальных макрофагах <i>in vitro</i>	11-12
Заключение	12-13
Список использованных источников	13-14



ВВЕДЕНИЕ

Иммобилизация олигонуклеотидов осуществляется на активированном с помощью пучка свободных электронов полиэтиленоксиде с молекулярной массой 1,5 кДа. Для исследования иммуотропных свойств иммобилизованные олигонуклеотиды применялись в лиофилизированном виде в смеси с крахмалом.

Терапевтическая доза иммобилизованных олигонуклеотидов (ООО «Саентифик фьючер менеджмент», Новосибирск) для мышей была определена как 10 мг/кг. Введение препарата осуществлялось перорально в течение 14 суток. В опытах *in vitro* препарат добавляли в культуру перитонеальных макрофагов в дозах, на порядок различающихся, от 0,00034 мкг/мл до 33,775 мкг/мл.

Задачей данного исследования в рамках общей программы доклинического изучения явилось углубленное исследование иммуотропной активности иммобилизованных олигонуклеотидов ДНК молок лососевых. Экспериментальная оценка иммуотропных свойств им-ОГН проводилась в опытах на животных *in vivo* с использованием следующих тестов: изучение влияния исследуемого препарата на функциональную активность естественных киллеров, пролиферативную активность Т- и В-лимфоцитов с помощью реакции бласттрансформации, общее количество лейкоцитов в периферической крови и гемограму. В системе *in vitro* исследовалось влияние им-ОГН на баланс макрофаг 1 (провоспалительных) и макрофаг 2 (противовоспалительных) по продукции соответственно оксида азота или аргиназы. Показано, что макрофаги, как и Т-лимфоциты, способны поляризоваться в макрофаг 1 (M1) или макрофаг 2 (M2) клетки под влиянием цитокинов Th1 (интерферон- γ) или Th2 (такие как ИЛ-4, ИЛ-10, ИЛ-13) профиля соответственно [4, 6, 8, 9, 10].

Известно, что главной отличительной чертой активированных тем или иным путем макрофагов является состояние метаболизма аргинина: у M1 макрофагов он утилизируется через индуцибельную NO-синтазу с образованием оксида азота, в то время как у M2 клеток - через аргиназу с образованием полиаминов и орнитина [6, 11].

Наиболее удачным для активации макрофагов по классическому типу, в настоящее время признается воздействие на них через TLR-9 (рецептор к ДНК). Примером могут служить работы по включению CpG-структуры (олигонуклеотид, лиганд к TLR9) в состав противоопухолевых вакцин в качестве адьюванта, стимулирующей Th1-зависимый иммунный ответ, которая показала свою эффективность при лечении меланомы и неходжкинской лимфомы [7]. Показано, что это вещество стимулирует иммунитет, создавая устойчивость к вирусным инфекциям, а также подавляет продукцию цитокинов Th2, что является еще одним направлением терапевтического использования его при лечении аллергических заболеваний, вызванных избыточной активацией Th2 [5].

1. МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

1.1. Материал

В исследовании были использованы 56 мышей-самцов линии СВА/СаЛас и 22 мыши-самца линии ВАLB/С массой 18-20 г в возрасте 1,5–2 мес, полученные из питомника НИИ фармакологии СО РАМН. Мыши линии ВАLB/С использовали в качестве источника перитонеальных макрофагов. Животные были конвенциональные 1-й категории (сертификат ГУ Научного центра биомедицинских технологий РАМН № 188-05). Содержание, питание, уход за животными и выведение их из эксперимента осуществляли в соответствии с требованиями «Правил проведения работ с использованием экспериментальных животных» (Приложение к приказу МЗ СССР от 12.08.1977 г. № 755).

Мышам линии СВА/СаЛас иммобилизированные олигонуклеотиды вводили перорально курсом в течение 14-ти суток в 1ТД (10 мг/кг) и 10ТД (100 мг/кг) в объеме 0,2 мл стерильного физиологического раствора, контрольные животные получали в эквивалентном объеме растворитель (физиологический раствор). В качестве фона использовали интактных животных соответствующего пола и возраста. В опытах *in vitro* иммобилизированные олигонуклеотиды добавляли в культуру клеток в дозах, на порядок различающихся, от 0,00034 мкг/мл до 33,775 мкг/мл. Забивали животных декапитацией под эфирным наркозом.

1.2. Методы оценки иммуностропной активности в опытах на животных *in vivo*

Иммуностропная активность иммобилизированных олигонуклеотидов в опытах на животных *in vivo* была оценена при помощи следующих методик:

- 1) изучение влияния исследуемого препарата на функциональную активность естественных киллеров мышей;
- 2) исследование влияния препарата на пролиферативную активность лимфоцитов мышей;
- 3) изучение влияния исследуемого препарата на общее количество лейкоцитов и лейкоцитарную формулу.

1) Изучение влияния исследуемого препарата на функциональную активность естественных киллеров мышей. Иммобилизированные олигонуклеотиды вводили мышам перорально курсом в течение 14-ти суток в 1ТД (10 мг/кг) и 10ТД (100 мг/кг) в объеме 0,2 мл стерильного физиологического раствора. Забивали животных декапитацией под эфирным наркозом и в стерильных условиях извлекали селезенку. Далее селезенку гомогенизировали в 5 мл раствора Хенкса с 1% эмбриональной телячьей сывороткой (ЭТС) с помощью стеклянного гомогенизатора и фильтровали через мелкую сеточку. Полученные спленоциты использовали в качестве источника естественных киллеров (ЕК).

Изучение влияния препарата на функциональную активность ЕК определяли в цитотоксической реакции по их способности лизировать клетки миелобластоидной линии К-562, используя колориметрический метод [2].

Клетки линии К-562 осаждали центрифугированием, осадок ресуспендировали в 0,04% растворе нейтрального красного и инкубировали 15 мин при 37⁰С. Окрашенные клетки дважды отмывали раствором Хенкса без индикатора с 1 % ЭТС, ресуспендировали в растворе Хенкса с 5 % ЭТС до концентрации 1x10⁵ кл/мл. Мишени (100 мкл) помещали в лунки 96-луночного круглодонного планшета и инкубировали 1 ч при 37⁰С. Спленоциты, отмывые раствором Хенкса с 1% ЭТС, ресуспендировали в растворе Хенкса с 5% ЭТС до концентрации 1x10⁶, 2,5x10⁶, 5x10⁶ кл/мл и добавляли к мишеням по 100 мкл. В качестве контроля мишеней брали 100 мкл раствора Хенкса с 5% ЭТС. Инкубация длилась 16 ч при 37⁰С во влажной атмосфере с 5% CO₂. После инкубации 100 мкл супернатанта из каждой лунки переносили в другой планшет. Оптическую плотность считывали на мульти-скане МСС («Labsistems») при длине волны 540 нм. Индекс естественной киллерной активности (ЕКА) определяли по формуле:

$$\text{ЕКА (\%)} = (\text{Т}_0 - \text{Т}_к) / \text{Т}_0 \times 100 \%,$$

где Т₀ - оптическая плотность в опыте, Т_к - в контроле.

2) Исследование влияния препарата на пролиферативную активность лимфоцитов мышей. Иммуобилизованные олигонуклеотиды вводили мышам перорально курсом в течение 14-ти суток в 1ТД (10 мг/кг) и 10ТД (100 мг/кг) в объеме 0,2 мл стерильного физиологического раствора. Забивали животных декапитацией под эфирным наркозом и в стерильных условиях извлекали селезенку. Далее селезенку гомогенизировали в 5 мл среды 199 с 1% ЭТС с помощью стеклянного гомогенизатора и фильтровали через мелкую сеточку. Полученные спленоциты дважды отмывали средой 199 с 1% ЭТС и использовали для постановки реакции бласттрансформации, которая в известной степени является интегральным методом определения функциональной активности лимфоцитов [3]. Этот метод основан на способности некоторых лектинов вызывать поликлональную активацию и пролиферацию лимфоцитов, которая оценивалась колориметрически [12]. Для активации Т-лимфоцитов использовали фитогемагглютинин (ФГА); для активации В-лимфоцитов – липополисахарид (ЛПС).

При постановке реакции бласттрансформации спленоциты доводили до концентрации 2 млн/мл полной ростовой средой (ПРС), состоящей из среды RPMI-1640, 10% эмбриональной телячьей сыворотки, 10мМ Нерес, 2 мМ L-глутамина, 0,05 мМ 2-меркаптоэтанола и 40 мкг/мл гентамицина. Реакцию ставили в объеме 100 мкл в 96 луночных плоскодонных планшетах. В опытные лунки вносили 50 мкл спленоцитов с указанной выше концентрацией клеток, 50 мкл Т (ФГА) или В (ЛПС) митогена в оптимальной дозе (15 мкг/мл и 15 мкг/мл соответственно; доза митогена была определена в предварительных экспериментах) - индуцированная бласттрансформация. В контрольные лунки вносили 50 мкл клеток и 50 мкл ПРС - спонтанная бласттрансформация. Планшеты направляли на 72 часа при температуре 37⁰С в CO₂-инкубатор, содержащий 5% CO₂. За 6 часов до окончания культивирования в каждую лунку вносили по 50 мкл раствора соли тетразолия (ХТТ) (непосредственно перед использованием смешивали 5 мг ХТТ, 5 мл раствора Хенкса и 100 мкл активирующего раствора, состоящего из феназина метасульфата

(PMS) в концентрации 0,383 мг/мл). Оценку реакции проводили на основании измерения оптической плотности при длине волны 492 нм, используя иммуноферментный анализатор «Униплан», производства ЗАО «Пикон», г. Москва. Каждую пробу ставили в трех лунках и результаты усредняли. Оценку результатов опыта определяли по двум показателям: оптическая плотность (у.е.) в лунках без добавления митогена и индекс стимуляции (ИС). Последний определяли по формуле:

$$\text{ИС} = \frac{\text{О}}{\text{К}}, \text{ где}$$

О – оптическая плотность в лунках с митогеном,

К – оптическая плотность в лунках без митогена.

3) Изучение влияния исследуемого препарата на общее количество лейкоцитов и лейкоцитарную формулу. Иммуобилизованные олигонуклеотиды вводили мышам перорально курсом в течение 14-ти суток в 1ТД (10 мг/кг) и 10ТД (100 мг/кг) в объеме 0,2 мл стерильного физиологического раствора. Подсчет общего количества лейкоцитов периферической крови и лейкоцитарную формулу осуществляли общепринятыми методами [1].

1.3. Методы оценки иммуностропной активности в опытах на культуре перитонеальных макрофагов *in vitro*

Для получения макрофагов интактных мышей забивали, брюшную полость промывали ледяным изотоническим раствором NaCl (здесь и далее – физиологический раствор - ФР), клетки осаждали, ресуспендировали в среде RPMI-1640 (ГНЦ ВБ «Вектор», РФ) с добавлением 10% эмбриональной телячьей сыворотки (ЭТС, «HyClone», США), 20 мМ HEPES («Sigma», США), 0,05 мМ 2-меркаптоэтанола («Sigma», США), 50 мкг/мл гентамицина («Sigma», США) и 2 мМ L-глутамина («Sigma», США), оценивали жизнеспособность, затем помещали по $1,5-2,0 \times 10^6$ /мл в пластиковые чашки Петри, культивировали 2 ч (в атмосфере 5% CO₂ и абсолютной влажности), после чего собирали только прилипшие к пластику клетки. Полученные макрофаги помещали в плоскодонные 96-луночные планшеты по 2×10^5 и культивировали 48 ч после чего оценивали продукцию оксида азота и экспрессию аргиназы.

Для определения продукции оксида азота макрофагами собирали из лунок надосадок и измеряли в нём количество нитритов при помощи реактива Грейса с использованием спектрофотометра «Titertek Multiscan MCC» («Titertek», Финляндия) при длине волны 540 нм.

В качестве лиганда TLR-9 использовали CpG-олигонуклеотид ODN1826 («InvivoGen», США). В качестве блокатора TLR-9 использовали ингибиторный олигонуклеотид ODN2088 («InvivoGen», США).

Экспрессию аргиназы оценивали по способности клеточного лизата образовывать мочевины по модифицированной нами методике [11]. Для этого макрофаги лизировали тритоном X-100 («Serva»), аргиназу активировали в присутствии 25 мМ Трис-НСl («Serva») и 10 мМ хлорида марганца («Реахим») (56°С 10 мин), добавляли 0,5 М L-

аргинин («Sigma», pH 9,7), культивировали 60 мин (37°C) и останавливали реакцию смесью серной и фосфорной кислот. Концентрацию мочевины в полученном растворе определяли с помощью тест-системы «Мочевина-450» («Био-ЛА-Тест») согласно приложенному протоколу с использованием спектрофотометра (540 нм). За 1 единицу активности (ЕА) фермента принимали количество аргиназы, катализирующей образование 1 мМ мочевины в минуту.

Статистическая обработка результатов осуществлялась с применением пакета статистических программ Statistica for Windows (версия 5.0) с предварительной оценкой нормальности распределения и использованием t-критерия Стьюдента.

2. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1. Результаты исследования иммуностропной активности в опытах на животных *in vivo*

2.1.1. Изучение влияния исследуемого препарата на функциональную активность естественных киллеров мышей

После курсового введения им-ОГН в дозе 10 мг/кг (1ТД) функциональная активность естественных киллерных клеток мышей повышалась как по сравнению с фоном, так и с группой контроля при всех изученных соотношениях мишеней к эффекторам, но статистически незначимо (табл. 1). При этом применение им-ОГН курсом в дозе 100 мг/кг (10ТД) достоверно усиливало цитотоксическую активность ЕК экспериментальных животных по сравнению с контролем при всех изученных соотношениях мишеней к эффек-

Таблица 1

Оценка влияния курсового введения иммобилизованных олигонуклеотидов в дозах 10 мг/кг (1ТД) и 100 мг/кг (10ТД) на функциональную активность естественных киллерных клеток ($\bar{X} \pm m, p$)

Исследуемые показатели	Экспериментальные группы			
	Группа 1 Фон (n=7)	Группа 2 Контроль (n=7)	Группа 3 им-ОГН (1ТД) (n=7)	Группа 4 им-ОГН (10ТД) (n=7)
ЕКА (%) соотношение мишеней: эффекторов 1:10	35,70±2,66	32,67±1,44	38,90±3,32	38,86±2,43 2-4p<0,05
ЕКА (%) соотноше- ние мишеней: эффекторов 1:25	35,24±2,26	34,20±1,23	39,61±2,54	39,36±1,55 2-4p<0,05
ЕКА (%) соотноше- ние мишеней: эффекторов 1:50	37,49±1,50	37,60±1,42	42,68±2,78	49,32±4,47 1-4p<0,05 2-4p<0,05

Примечание: n – количество животных в группе.

торам, а при соотношении мишеней к эффекторам 1:50 функциональная активность естественных киллеров статистически значимо возрастала и по сравнению с фоном.

2.1.2. Исследование влияния препарата на пролиферативную активность лимфоцитов

После курсового введения им-ОГН в дозе 10 мг/кг (1ТД) наблюдалось достоверное повышение спонтанной пролиферативной активности лимфоидных клеток экспериментальных животных как по сравнению с фоном, так и с группой контроля (табл. 2). При этом индекс стимуляции Т-лимфоцитов статистически значимо не изменялся как в группе с применением им-ОГН в терапевтической дозе (10 мг/кг), так и в дозе на порядок ее превышающую (100 мг/кг). Однако индекс стимуляции В-лимфоцитов в обеих опытных группах с курсовым введением им-ОГН в дозе 10 мг/кг и 100 мг/кг был достоверно выше соответствующего показателя контрольной группы.

Таблица 2

Оценка влияния курсового введения иммобилизованных олигонуклеотидов в дозах 10 мг/кг (1ТД) и 100 мг/кг (10ТД) на пролиферативную активность лимфоцитов мышей линии СВА/СаLас ($\bar{X} \pm m, p$)

Исследуемые показатели	Группы экспериментальных животных			
	Группа 1 Фон (n=7)	Группа 2 Контроль (n=7)	Группа 3 им-ОГН (1ТД) (n=7)	Группа 4 им-ОГН (10ТД) (n=7)
Спонтанная пролиферация (ед. опт. плот.)	0,196±0,016	0,217±0,005	0,238±0,007 1-3p<0,05 2-3p<0,05	0,206±0,006 3-4p<0,01
ИС (ФГА)	1,11±0,08	1,06±0,02	1,12±0,03	1,23±0,16
ИС (ЛПС)	1,94±0,22	1,53±0,15	2,09±0,07 2-3p<0,01	1,99±0,14 2-4p<0,05

Примечание: n – количество животных в группе.

2.1.3. Изучение влияния исследуемого препарата на общее количество лейкоцитов и лейкоцитарную формулу

Курсовое введение им-ОГН как в дозе 10 мг/кг (1ТД), так и в дозе на порядок ее превышающую (100 мг/кг) не приводило к достоверным изменениям общего количества лейкоцитов в периферической крови и их отдельных морфологических форм относительно соответствующих значений в контрольной группе (табл. 3). Лишь по сравнению с исходным уровнем наблюдалось статистически значимое снижение числа сегментоядерных лейкоцитов в группе с применением им-ОГН в терапевтической дозе (10 мг/кг) и в группе

с введением им-ОГН в дозе 100 мг/кг, кроме этого в данной группе отмечалось достоверное падение ОКЛ и содержания лимфоцитов относительно соответствующих значений в фоновой группе.

Таблица 3

Оценка влияния курсового введения иммобилизованных олигонуклеотидов в дозах 10 мг/кг (1ТД) и 100 мг/кг (10ТД) на общее количество лейкоцитов в периферической крови ($10^9/л$) мышей линии СВА/СаЛас и их отдельных морфологических форм ($\bar{X} \pm m, p$)

Исследуемые показатели	Группы экспериментальных животных			
	Группа 1 Фон (n=7)	Группа 2 Контроль (n=7)	Группа 3 им-ОГН (1ТД) (n=7)	Группа 4 им-ОГН (10ТД) (n=7)
ОКЛ	20,43±1,65	16,71±0,98	17,46±1,76	14,0±0,91 1-4p<0,01
Палочкоядерные нейтрофилы	0,12±0,09	0,19±0,09	0,05±0,03	0,12±0,04
Сегментоядерные нейтрофилы	7,41±0,67	5,33±0,57 1-2p<0,05	4,64±0,33 1-3p<0,05	4,01±0,53 1-4p<0,01
Эозинофилы	0,12±0,04	0,14±0,05	0,09±0,03	0,15±0,06
Моноциты	0,31±0,14	0,17±0,10	0,10±0,03	0,35±0,08
Лимфоциты	12,50±1,09	10,87±0,73	12,59±1,64	9,37±0,52 1-4p<0,05

Примечание: n – количество животных в группе.

2.2. Результаты исследования иммуностимулирующей активности в опытах на культуре перитонеальных макрофагов *in vitro*

Исследуемый препарат (табл. 4) дозозависимо стимулировал продукцию оксида азота в концентрациях 3,3775 и 33,775 мкг/мл. На экспрессию аргиназы препарат не оказывал влияния.

Для выяснения роли рецептора TLR-9 в стимуляции оксида азота препаратом были использованы коммерческий лиганд TLR-9 (CpG-олигонуклеотид ODN1826) и блокатор TLR-9 (ингибиторный олигонуклеотид ODN2088). Результаты исследования представлены в таблице 5. Стимулирующее действие CpG-олигонуклеотида дозозависимо отменялось при блокировании рецептора TLR-9. Действие исследуемого препарата также отменялось ингибиторным олигонуклеотидом ODN2088.

Таким образом, исследуемый препарат обладает стимулирующим действием в отношении макрофагов. Это действие опосредуется макрофагальным рецептором TLR-9.

Таблица 4

Влияние иммобилизованных олигонуклеотидов на экспрессию аргиназы и продукцию оксида азота перитонеальными макрофагами ($\bar{X} \pm m$)

Концентрация вещества /имм. олигонуклеотидов (мкг/мл)	Показатели	
	NO (нитриты, мкМ)	экспрессия аргиназы (ЕА)
контроль (без добавления препарата)	19,0±1,0	8,1±1,5
0,007/0,00034	21,4±1,9	-
0,070/0,00338	19,9±1,3	-
0,700/0,03378	19,7±1,5	7,7±0,8
7,000/0,33775	18,9±1,7	10,1±1,4
70,000/3,37750	27,0±2,5*	9,0±1,3
700,000/33,7750	49,5±3,2*	7,7±1,7

Примечание: * - достоверные различия с контролем ($p < 0,05$).

Таблица 5

Роль TLR-9 в стимуляции продукции оксида азота перитонеальными макрофагами иммобилизованными олигонуклеотидами ($\bar{X} \pm m$)

Условия культивирования	Продукция оксида азота в присутствии:			
	- контроль-1	2,5 мкМ лиганда TLR-9	3,3775 мкг/мл имм. олигонуклеотидов	33,775 мкг/мл имм. олигонуклеотидов
- контроль-2	0	14,3±0,5*	6,7±1,0*	10,4±0,6*
+ блокатор TLR-9 1,25 мкМ	0	7,8±0,6*#	0#	4,0±0,5*#
+ блокатор TLR-9 2,5 мкМ	0	0#	0#	0#

Примечания: * - достоверные различия с контролем-1 ($p < 0,05$);

#- достоверные различия с контролем-2 ($p < 0,05$).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Курсовое введение иммобилизованных олигонуклеотидов ДНК молок лососевых в дозе 100 мг/кг (10ТД) усиливало цитотоксическую активность естественных киллеров экспериментальных животных при всех изученных соотношениях мишеней к эффекторам (1:10, 1:25 и 1:50).

После курсового введения иммобилизованных олигонуклеотидов в терапевтической дозе наблюдалось повышение спонтанной пролиферативной активности лимфоидных клеток экспериментальных животных. При этом индекс стимуляции В-лимфоцитов в

обеих опытных группах с курсовым введением иммобилизованных олигонуклеотидов в терапевтической дозе и в дозе, на порядок ее превышающую, возрастал.

Применение курсом им-ОГН как в 1ТД, так и в дозе, на порядок превышающую терапевтическую (10ТД), не приводило к статистически значимым изменениям общего количества лейкоцитов в периферической крови и их отдельных морфологических форм у мышей линии СВА/СаЛас.

Исследуемый препарат дозозависимо стимулировал продукцию оксида азота в концентрациях 3,3775 и 33,775 мкг/мл. На экспрессию аргиназы препарат не оказывал влияния. Стимулирующее действие им-ОГН опосредуется макрофагальным рецептором TLR-9.

Таким образом, иммуностимулирующие свойства иммобилизованных олигонуклеотидов проявляются в усилении цитотоксической активности естественных киллеров экспериментальных животных при применении исследуемого препарата в высокой дозе. Кроме этого, курсовое применение им-ОГН повышало спонтанную пролиферативную активность лимфоидных клеток и индекс стимуляции В-лимфоцитов экспериментальных животных. При добавлении иммобилизованных олигонуклеотидов в культуру перитонеальных макрофагов *in vitro* отмечалась дозозависимая стимуляция функциональной активности изучаемых клеток, которая проявлялась в повышении продукции оксида азота. Стимулирующее действие исследуемого препарата отменялось при блокировании рецептора TLR-9 ингибиторным олигонуклеотидом ODN2088. Можно сделать вывод о том, что данный эффект иммобилизованных олигонуклеотидов опосредуется макрофагальным рецептором TLR-9.

Список использованных источников

1. Гольдберг Е.Д., Дыгай А.М., Шахов В.П. Методы культуры ткани в гематологии. - Томск, 1992. – 264 с.
2. Кузовкова Н.А. Оценка активности естественных киллеров колориметрическим методом // Иммунология. – 1991. - №4. – С.59-61.
3. Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ.- М., 2005 – 832 с.
4. Goerdts S. Orfanos C.E. Other functions, other genes: alternative activation of antigen-presenting cells // Immunity. - 1999. - Vol. 10. - P. 137–142.
5. Holtzman M.J. Drug Development for Asthma // Am. J. Respir. Cell Mol. Biol. – 2003. – Vol. 29. - P. 163–171.
6. Kreider T., Anthony R.M., Urban J.F. Jr., Gause W.C. Alternatively activated macrophages in helminth infections // Current Opinion in Immunology. - 2007. - Vol. 19. - P. 448–453.
7. Krieg A.M. CpG motifs in bacterial DNA and their immune effects // Annu. Rev. Immunol. - 2002. - V. 20. - P. 709–760.

8. Mantovani A., Sozzani S., Locati M., Allavena P., Sica A. Macrophage polarization: tumor-associated macrophages as a paradigm for polarized M2 mononuclear phagocytes // *TRENDS in Immunology*. - 2002. - Vol. 23 (№ 11). - P. 549-555.
9. Mills C.D., Kincaid K., Alt J.M., Heilman M.J., Hill A.M. M-1/M-2 macrophages and the Th1/Th2 paradigm // *J. Immunol.* - 2000. - Vol. 164. - P. 6166–6173.
10. Mosser D.M. The many faces of macrophage activation // *Journal of Leukocyte Biology*. - 2003. - Vol. 73. - P. 209-212.
11. Munder M., Eichmann K., Modolell M. Alternative Metabolic States in Murine Macrophages Reflected by the Nitric Oxide Synthase/Arginase Balance: Competitive Regulation by CD41 T Cells Correlates with Th1/Th2 Phenotype // *J. Immunol.* - 1998. - Vol. 160. - P. 5347–5354.
12. Scudiero P.A. et al. // *Cancer Res.* – 1988. – Vol. 48. – P.4827-4833.

