

УДК 615.015

**Б. М. Галкін**, д-р біол. наук, проф., **Т. Ю. Степанова**, асп.,**К. Д. Крилова**, студ.

Одеський національний університет ім. І. І. Мечникова,

кафедра мікробіології і вірусології,

вул. Дворянська, 2, Одеса, 65026, Україна

## ВПЛИВ ТІЛОРОНУ НА ФУНКЦІОНАЛЬНУ АКТИВНІСТЬ МАКРОФАГІВ *IN VITRO* В НОРМІ ТА ЗА ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО АЛЕРГІЧНОГО ЕНЦЕФАЛОМІЄЛІТУ

Досліджено вплив тілорону на активність макрофагів здорових мишей та мишей з експериментальним алергічним енцефаломієлітом (ЕАЕ) *in vitro*. Показано, що препарат пригнічує *in vitro* активність катепсину D у перитонеальних макрофагах, але не змінює здатність цих клітин відновлювати нітросиній тетразолій (НСТ). На досліджувані показники у селезінкових макрофагах препарат чинить різноспрямовану дію. Встановлено, що тілорон відновлює до норми активність макрофагів черевної порожнини у НСТ-тесті та активність катепсину D в макрофагах селезінки - показники, які знижуються на тлі ЕАЕ.

**Ключові слова:** макрофаги, тілорон, експериментальний алергічний енцефаломієліт, катепсин D, НСТ-тест.

Експериментальний алергічний енцефаломієліт (ЕАЕ) — аутоімунне захворювання ЦНС, подібне до розсіяного склерозу (РС), — є зручною моделлю для вивчення демієлінізуючих захворювань людини. За останні роки було встановлено деякі механізми участі імунної системи в патогенезі РС та ЕАЕ [1]. Значну роль в цьому процесі грають моноцити і макрофаги (Мф). В останній час вивчення засобів зі спрямованим впливом на функції макрофагів, як найважливішого ланцюга гострого та хронічного запалення, набуває особливого значення. Для регуляції імунної відповіді в медичній практиці все частіше використовуються імуномодулятори з різними механізмами дії. Одним з таких препаратів є тілорон (аміксин) — синтетичний низькомолекулярний індуктор ендogenous інтерферону. Раніше нами було показано [2], що аміксин підвищує поглинальну здатність макрофагів, а також інтенсифікує окисно-відновні процеси *in vivo*. Відомо, що тілорон може впливати на деякі імунні реакції безпосередньо, в той час як зміна активності інших опосередковується інтерфероном [3]. Модельне захворювання, в свою чергу, викликає зниження функціональної активності Мф і дефіцит системи імунітету [4, 5].

Метою даної роботи було вивчення впливу тілорону на функціональну активність макрофагів *in vitro* в нормі та за ЕАЕ у початковий період розвитку захворювання.

## Матеріали та методи

В експерименті використовували самців мишей масою 18–20 г, яких утримували в стандартних умовах віварію з постійним доступом до води. Остання годівля відбувалася за 24 години до експерименту.

У частини тварин індукували ЕАЕ введенням 50% гомогенату гомологічного мозку з рівним об'ємом повного ад'юванту Фрейнда у задні лапи під апоневроз [6]. На 3 добу після індукції ЕАЕ виділяли Мф з селезінки та перитонеальної порожнини за методом [7]. Отриманий моношар Мф інкубували з розчином тілорону у концентрації 50 мкг/мл протягом 60 хв. Контролем були Мф мишей, які інкубували без препарату. Стан окисно-відновних систем макрофагів оцінювали за кількістю відновленого ними до диформазану нітросинього тетразолію (НСТ-тест) [8]. Активність катепсину D вимірювали у макрофагах (в мкг тирозину на  $10^6$  клітин) за методом [9].

## Результати та їх обговорення

Раніше нами було встановлено [4], що через три доби після введення мишам енцефалітогенної емульсії відбувається зниження активності як тканинних, так і порожнинних макрофагів. Здібність відновлювати НСТ макрофагами, вилученими з селезінки та черевної порожнини, зменшувалась на 41% і 27%, відповідно. Зниження активності катепсину D у Мф селезінки становило 49%, а у Мф з черевної порожнини — 21%. Таке пригнічення активності може бути пов'язано з високим антигенним навантаженням на організм, яке відбувається під час відтворення захворювання. Більш значні зміни у тканинних фагоцитах пов'язані, можливо, з тим, що саме макрофаги селезінки поглинають основну частину антигену та компонентів ад'юванту, які потрапляють у кров з місту введення.

При додаванні тілорону до моношару макрофагів здорових тварин спостерігалися різноспрямовані зміни досліджуваних параметрів у клітинах різного походження (рис. 1).

Так, при інкубації з препаратом інтенсивність окислювально-відновних процесів у НСТ-тесті майже не змінювалась в перитонеальних Мф і знижувалась до 66% у Мф селезінки в порівнянні з контролем. У той же час, тілорон суттєво (у 2,5 рази) пригнічує активність катепсину D у клітинах черевної порожнини і не змінює її у макрофагах селезінки.

При інкубації з тілороном клітин, що були виділені від мишей з ЕАЕ, спостерігалась протилежна картина (рис. 2). В НСТ-тесті спостерігалось зростання активності перитонеальних макрофагів (на 27%), тоді як здатність фагоцитів селезінки відновлювати барвник не змінювалась. Тілорон практично не впливав на активність катепсину D у порожнинних макрофагах, але підвищував її у селезінкових Мф. При цьому збільшення активності в клітинах селезінки склало 42%, і вона досягла рівня, притаманного клітинам

контрольних тварин. Таким чином, на тлі ЕАЕ препарат нормалізує активність клітин перитонеального ексудату в НСТ-тесті та активність катепсину D в макрофагах селезінки.

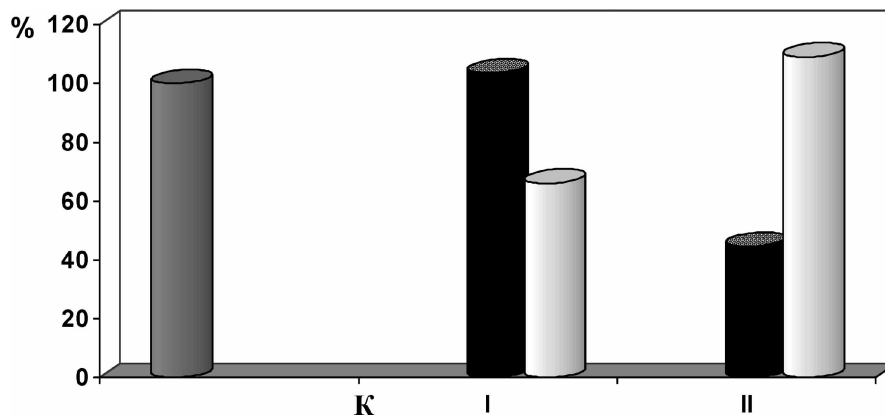


Рис. 1. Вплив тілорону на функціональну активність макрофагів мишей *in vitro* в нормі

Примітка: по вертикалі — активність макрофагів, %; по горизонталі: К — контроль, I — активність в НСТ-тесті, II — активність катепсину D; затемнені стовпчики — перитонеальні макрофаги, світлі стовпчики-макрофаги селезінки; \* — різниця вірогідна в порівнянні з контролем.

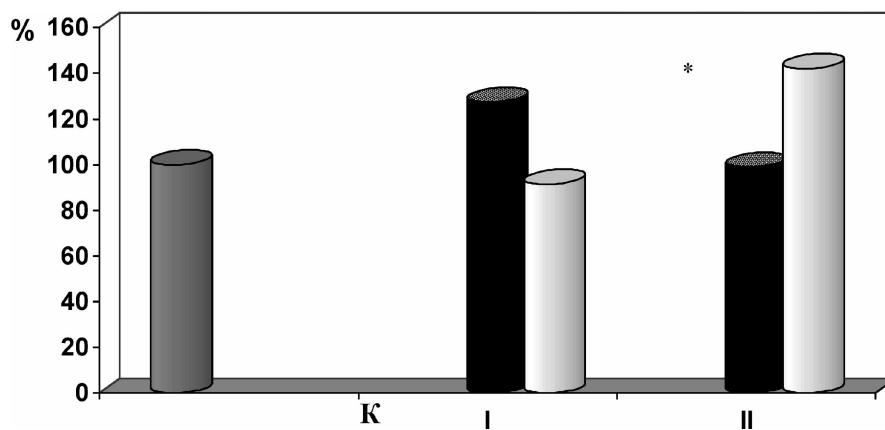


Рис. 2. Вплив тілорону на функціональну активність макрофагів мишей з ЕАЕ *in vitro*

Примітка: по вертикалі — активність макрофагів, %; по горизонталі: К — контроль, I — активність в НСТ-тесті, II — активність катепсину D; затемнені стовпчики-перитонеальні макрофаги, світлі стовпчики-макрофаги селезінки; \* — різниця вірогідна в порівнянні з контролем.

Таким чином, отримані дані свідчать про можливість прямої регуляції деяких функцій макрофагів тилороном. Це дає змогу припустити, що *in vivo*, скоріше за все, діють два механізми модуляції активності імуноцив препаратом: безпосередній вплив на ті чи інші клітини та опосередкована інтерфероном дія. Крім того, у роботі встановлені різноспрямовані ефекти тилорону відносно макрофагів різної локалізації в організмі, з одного боку, і макрофагів здорових та хворих на ЕАЕ тварин, з другого боку. Перше, скоріше за все, пов'язано з особливостями спеціалізації функцій порожнинних та тканинних макрофагів, крім того, відомо, що ці клітини відрізняються одна від одної активністю низки ферментів: НАДФ-Н-оксидази, сукцинатдегідрогенази, катепсину D [10]. Раніше нами було встановлено що тилорон по-різному впливає на системи перекисного окиснення та антиоксидантного захисту в різних органах в нормі та за патології [11], тому викликає інтерес дослідження дії препарату на перитонеальні та селезінкові макрофаги у інтактних тварин та за ЕАЕ *in vivo*.

### Висновки

1. Індуктор ендogenous інтерферону — тилорон, пригнічує *in vitro* активність катепсину D у перитонеальних макрофагах, але не змінює здатність цих клітин відновлювати НСТ. На досліджувані показники у селезінкових макрофагах препарат чинить різноспрямовану дію.

2. Тилорон відновлює до рівня норми активність макрофагів черевної порожнини у НСТ-тесті та активність катепсину D в макрофагах селезінки, які знижуються на тлі ЕАЕ.

### Література

1. *Мальшева О. А., Ширинский В. С.* Проблемы и перспективы лечения больных рассеянным склерозом // *Аллергология и иммунология.* — 2002. — № 1. — С. 84–99.
2. *Степанова Т. Ю.* Вплив аміксину на функціональну активність макрофагів різного походження // *Вісник Одеського національного університету. Біологія.* — 2004. — Т. 9, № 2. — С. 188–192.
3. *Chandra P., Wright G. J.* Tilorone hydrochloride: the drug profile // *Top. Curr. Chem.* — 1977. — Vol. 72, N 1. — P. 125–148.
4. *Степанова Т. Ю., Філіпова Т. О., Галкін Б. М.* Функціональний стан макрофагів та активність катепсину D у мишей з експериментальним алергічним енцефаломієлітом // *Досягнення експериментальної біології та медицини.* — 2005. — Т. 5, № 1. — С. 57–61.
5. *Levine S., Sowinski R., Abreu S. L.* Suppression of EAE by Tilorone: Cell transfer and Interferon Studies // *Immunopharmacology.* — 1983. — Vol. 6, N 1. — P. 23–31.
6. *Заргарова Т. А., Фаворова О. О.* Экспериментальный аутоиммунный энцефаломиелит — модель рассеянного склероза // *Иммунология.* — 1999. — № 2. — С. 5–9.
7. *Kaminski N. E., Roberts I. F., Guthrie F. E.* A rapid spectrophotometric method for assessing macrophage phagocytic activity // *Immunology Lett.* — 1985. — Vol. 10, N 6. — P. 329–31.

8. *Technique colorimetrique d'evaluation de l'activite phagocytere des macrophages peritoneaux de souris* / D. Raichvarg, E. Marchand, G. Sarfati, J. Agneray // *Ann. Immunol.* — 1980. — D. 131, N 1. — P. 71–78.
9. *Короленко Т. А., Свечникова И. Г.* Регуляция цистеиновых протеиназ лизосом клеток печени при стимуляции и депрессии макрофагов // *Вестник РАМН.* — 1998. — № 10. — С. 26–29.
10. *Маянский Д. Н.* Кооперативное взаимодействие клеток при иммунном ответе // *Успехи совр. биол.* — 1982. — Т. 93. — № 2. — С. 3–9.
11. *Влияние тилорона на системы перекисного окисления и антиперекисной защиты в норме и при патологии* / Галкин Б. Н., Баринов В. А., Тиунов Л. А. и др. // *Вопросы медицинской химии.* — 1990. — Т. 36, № 1. — С. 60–62.

**Б. Н. Галкин, Т. Ю. Степанова, Е. Д. Крылова**  
Одесский национальный университет им. И. И. Мечникова,  
кафедра микробиологии и вирусологии,  
ул. Дворянская, 2, Одесса, 65 026, Украина

**ВЛИЯНИЕ ТИЛОРОНА НА ФУНКЦИОНАЛЬНУЮ  
АКТИВНОСТЬ МАКРОФАГОВ IN VITRO В НОРМЕ  
И ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ АЛЛЕРГИЧЕСКОМ  
ЭНЦЕФАЛОМИЕЛИТЕ**

**Резюме**

В работе изучено влияние тилорона на активность макрофагов здоровых мышей и мышей с экспериментальным аллергическим энцефаломиелитом *in vitro*. Показано, что препарат угнетает *in vitro* активность катепсина D в перитонеальных макрофагах, но не изменяет способность этих клеток восстанавливать НСТ. На исследуемые показатели в макрофагах селезенки препарат оказывает разнонаправленное действие. Установлено, что тилорон восстанавливает до нормального уровня активность макрофагов брюшной полости в НСТ-тесте и активность катепсина D в макрофагах селезенки, сниженные на фоне ЭАЭ.

**Ключевые слова:** макрофаги, тилорон, экспериментальный аллергический энцефаломиелит, катепсин D, НСТ-тест.

**B. N. Galkin, T. Yu. Stepanova, E. D. Krylova**  
I. I. Mechnikov Odessa National University,  
Microbiology and Virology Department,  
Dvoryanskaya St., 2, Odessa, 65026, Ukraine

**THE INFLUENCE OF TILORONE ON THE ACTIVITY OF  
MACROPHAGES IN VITRO IN NORMAL STATE AND ON THE  
MODEL OF EXPERIMENTAL ALLERGIC ENCEPHALOMYELITIS**

**Summary**

The influence of tilorone on the activity of spleen and peritoneal cavity macrophages and activity of cathepsin D in these cells has been studied on the model of experimental allergic encephalomyelitis *in vitro*. It has been shown that tilorone decreases the activity of cathepsin D *in vitro* and doesn't alter the capability of peritoneal macrophage cells to

reduce NBT. Tilorone effects spleen macrophages in a reciprocal way. It has also been shown that tilorone increases the activity of peritoneal cavity macrophages in TBN-test and the activity of cathepsin D in spleen macrophages up to normal level, thus this activity was decreased due to experimental allergic encephalomyelitis.

**Keywords:** macrophages, tilorone, experimental allergic encephalomyelitis, cathepsin D, NBT-test.