«Рутан» препаратининг иммунотроп хоссаларини ўрганиш бўйича ҲИСОБОТ

ТАСДИҚЛАЙМАН
ЎЗБЕКИСТОН РЕСПУБЛИКАСИ
ФАНЛАР АКАДЕМИЯСИНИНГ
ИММУНОЛОГИЯ ВА ИНСОН ГЕНОМИКАСИ
ИНСТИТУТИ ДИРЕКТОРИ
АКАДЕМИК АРИПОВА Т.У.

_____
«____» _____ _____

«Рутан» препаратининг иммунотроп хоссаларини ўрганиш бўйича ҲИСОБОТ

ЎзР ФА иммунология ва инсон геномикаси институти фундаментал иммунология лабораторияси илмий ходимлари томонидан Рутан дори воситасининг ин витро шароитида иммунотроп хоссаларини ўрганиш бўйича иммунологик тадқиқотлар олиб борилди (клиника олди тадқиқотлари).

Тадқиқотнинг мақсади: ин витро тажрибаларида Рутан препаратининг иммунитетнинг ҳужайра ва гуморал омилларига таъсирини ўрганиш.

Тадқиқот вазифалари:

1. Ин витро тажрибаларида Рутан препаратининг турли дозаларида CD38+ нинг барвақт фаоллашиш асосий маркерига иммунотроп фаоллигини ўрганиш;
2. Ин витро тажрибаларида турли дозалардаги Рутан препаратининг ИФН-альфа ҳосил бўлишга таъсирини ўрганиш;
3. Ин витро тажрибаларида турли дозалардаги Рутан препарати таъсирида ИФН-гамма ҳосил бўлишини ўрганиш;
4. Ин витро тажрибаларида турли дозадаги Рутан препарати таъсирида цитокин бўронининг рўй бериши, яъни ИЛ-1 ва ИЛ-6 ишлаб чиқарилишини ўрганиш.

Тадқиқот материали ва усуллари

Рутан препаратининг иммунотроп фаоллигини ўрганиш учун CD38+ моноклонал антитанадан фойдаланилди (ишлаб чиқарувчи ООО «Сорбент», Москва).
100мг ва 250 мг дозалардаги Рутан таъсирида асосий интерферонлар альфа ва гамма, шунингдек ИЛ-6 ва ИЛ-1 бета ҳосил бўлишини ўрганиш учун 10 та соғлом одам ва 15 та ўткир респиратор вирусли инфекция (ЎРВИ) билан касалланган беморлар периферик қони олинди.
Юқорида келтирилган дори воситаси таъсирида мононуклеарларнинг интерферон-индукциялаш фаоллигини тадқиқ қилиш мақсадида ИФН-альфа, ИФН-гамма, ИЛ-1 бета, ИЛ-6 ва ИЛ-10 иммунофермент тест-системалардан фойдаланилди (ишлаб чиқарувчи «Вектор-Бест», Новосибирск, 2020й.).
Тадқиқотлар ин витро тажрибаларида олиб борилиб, унда мононуклеар культура учун мўлжалланган тестлар тўплами қўлланилди (ишлаб чиқарувчи «Вектор-Бест», Новосибирск). Дори воситасининг экспериментал дозалари унинг қўлланиш йўриқномасида мувофиқ, терапевтик дозасидан келиб чиққан холда ҳисоблаб чиқилди.

Тадқиқот натижалари

Текширилувчи шахслар (соғлом ва ЎРВИ ксалланган шахслар) веноз қонларидан ажратиб олинган

лимфоцитларда CD38+ барвақт активация маркери экспрессияси фаоллиги ин витро тажрибалари қуйида келтирилган.

Периферик веноз қонидан иммун тизими ҳужайралари (лимфоцитлар) ажратиб олиниб, текширилаётган препаратнинг турли дозаларида инкубация қилинди. Ички назорат сифатида физиологик эритмада инкубация қилинган лимфоцитлардан фойдаланилди. Лимфоцитлар 1 соат давомида 37^0С ҳароратда инкубация қилинди. Сўнг моноклонал антитаналардан фойдаланган холда лимфоцитларда CD38+ экспрессияси текширилди. Олинган натижалар 1-жадвалда келтирилган.

Тажриба натижалари шуни кўрсатдики, соғлом одамлар гуруҳида CD38+ экспрессияси ўртача 27,2±1,6% ташкил қилиб, бу лимфоцитларда ушбу маркер экспрессиясининг ўртача қийматини характерлайди ҳамда лимфоцитларнинг меъёр чегарасида фаоллашганлигини билдиради. ЎРВИ гуруҳида CD38+ экспрессияси ўртача 35,2±1,4% ташкил қилиб, ўткир респиратор вирус инфекцияси фонида иммун ҳужайралари звеносининг зўриқиб ишлаганидан дарак берди. Турли дозадаги препарат таъсирида соғлом одамлар иммун ҳужайраларида сезиларли ўзгаришлар кузатилмади. Олинган натижалар адабиёт маълумотларига мос келиб, уларда иммунотроп дори воситалари таъсирида соғлом одамлар гуруҳи иммунитетининг ҳужайра факторида ўзгаришлар кузатилмаслиги келтирилган бўлиб, бу яна бир бор иммунотроп моддалар меъёрда иммун кўрсаткичларига таъсир қилмаслигини кўрсатди. Тадқиқотлар шу нарса маълум бўлдики, текширилаётган препарат соғлом одамлар иммун ҳужайраларида CD38+ экспрессиясига таъсир кўрсатмайди.

1-жадвал

Рутан препарати билан инкубация қилишдан аввал ва кейинги CD38+ қиймати, M±m

Кўрсаткич	Меъёрий қиймат	ЎРВИ касаллар	Физ. эритма билан инкубация	Рутан 100 мг билан инкубация	Рутан 250 мг билан инкубация
CD38+, %	27,2±1,6	35,2±1,4*	26,8±1,2	28,2±1,4	26,8±1,31

Изоҳ: * - назорат билан фарқларнинг ишончлилиги

1-жадвалдан шуни кўриш мумкинки, CD38+ қиймати турли дозаларда Рутан билан инкубация қилингандан сўнг сезиларли ўзгармади. Бунда ушбу фаоллаштирувчи маркер экспрессиясининг пасайиш тенденцияси кузатилиб, ўрганилаётган дори моддаси иммун ҳужайралари мембраналаридаги рецепторлар фаоллашувини бостиришидан далолат беради. CD38+ экспрессияси Рутан 250мг таъсирида энг кўп пасайиб, у 26,8±1,31% қийматни ташкил қилади. Бинобарин, лимфоцитларда CD38+ барвақт активация маркерининг энг паст қиймати ЎРВИ беморларда Рутан 250мг билан инкубация қилинганда кузатилди. Шуни таъкидлаш жоизки, бундай холат ўткир коронавирус инфекцияси билан касалланиш жараёнида ҳам кузатилиши мумкин, чунки унинг кечиши ҳам ўткир респиратор вирусли инфекция патогенезига мос келади.

Бундан ташқари Рутан 100 ва 250 мг препаратининг интерферон-индукциялаш фаоллиги ҳам ўрганилди.

- дозалардаги Рутан таъсирида интерферон-альфа ва интерферон-гамма ҳосил бўлиши текширилганда соғлом одамлар иммун ҳужайраларида, яъни назорат гуруҳида сезиларли ўзгаришлар кузатилмаганлиги маълум бўлди. Бу препарат иммун тизими ҳужайралар томонидан ИФН-альфа индукциялаш самарасига эга эмаслигидан, шу билан бирга уларни

соғлом одамларда ҳам ўткир респиратор вирусли инфекцияга чалинган шахсларда ҳам фаоллашувига олиб келмаслигидан дарак беради. ЎРВИ чалинганлар гуруҳида ИФН-альфанинг зардобдаги ва спонтан (ўз-ўзидан) концентрацияси сезиларли даражада кўпаймаганлиги кузатилиб, бу инфекцион жараёнининг физиологик кечиши билан характерланади. ИФН-альфанинг спонтан ишлаб чиқарилиши ички назорат кўрсаткичи бўлиб хизмат қилиб, ЎРВИ беморларда ҳақиқий ишлаб чиқарилди.

Иммунология нуқтаи назаридан, қўшимча ИФН-альфа ҳосил бўлиш мавжуд бўлмаган тақдирда бундай тартиб жуда муваффақиятли бўлиб, у энг кучли яллиғланишга қарши оқсилни ишлаб чиқаришни рағбатлантирмайди. Унинг даражаси иммун тизими томонидан батамом назорат қилиниши керак.

2-жадвалдан шуни кўриш мумкинки, назорат билан солиштирганда (вирус антигени) ИФН-альфа индукцияси кузатилмади. ЎРВИ билан касалланган беморларда озгина спонтан интерферон индукцияси кузатилди. Бироқ турли дозадаги Рутан таъсирида ИФН-альфа ишлаб чиқарилиши кузатилмади. Бу яна бир бор текширилаётган дори воситаси интерферон-альфа индукциялаш хоссасига эга эмаслигидан далоат беради.

ИФН-гамма даражасини ўрганиш шуни кўрсатдики, Рутан 100 ва 250мг таъсирида ИФН-гамма сезиларли ишлаб чиқариш кузатилмади. Бироқ ИФН-гамма аҳамиятсиз ишлаб чиқариш тенденцияси мавжуд бўлиб, одатда бундай аҳамиятсиз ишлаб чиқариш ИФН-гамма кам ишлаб чиқарадиган сурункали вирусли касалликка чалинган одамларда муҳим бўлиши мумкин (герпес).

2-жадвал

Рутан препаратининг интерферон-индукциялаш фаоллиги, M±m

Қиймати	Вирус антигени таъсирида индукция (назорат)	Ички назорат (спонтан ишлаб чиқариш)	Рутан 100 мг таъсирида индукция	Рутан 250 мг таъсирида индукция
ИФН-альфа, пг/мл	169,58±6,52	17,45±7,3	8,5±0,19*	9,3±1,52*
ИФН-гамма, пг/мл	18,92±2,70	14,8±3,3	16,82±1,42	18,83±1,70

Изоҳ: * - гуруҳлар ўртасидаги фарқларнинг ички назоратга нисбатан ишончлилиги

Беморлар периферик қони зардобидаги ИФН-гамма миқдори 5,89±0,3 пг/мл, препаратсиз спонтан индукция натижасида – 14,8±3,3 пг/мл. Рутан 100 ва 250мг билан сутка давомидаги инкубация натижасида ИФН-гамма ишлаб чиқиш салгина ортиб, бу кўрсаткич ички назорат (спонтан ишлаб чиқиш) ва ташқи назорат (вирус антигени) билан таққослаганда аҳамиятли эмас. ИФН-гамма даражаси Рутан 100 мг билан инкубация қилинганда– 16,82±1,42 пг/мл, Рутан 250 мг – 18,83±1,70 пг/мл.

Шундай қилиб, Рутан 100 ва 250 мг таъсирида ИФН-гамма индукцияси кузатилмайди. Препарат таъсирида кам миқдорда ИФН-гамма ишлаб чиқилиб, буни дори воситасининг аҳамиятсиз ИФН-гамма ишлаб чиқариш қобилияти сифатида қараш мумкин.

Бизга маълумки, эндоген интерферон ишлаб чиқаришни қўшимча фаоллаштириш маҳсус яллиғланиш медиаторларини қўшимча ишлаб чиқишига сабаб бўлади.

Шунингдек, организмда антигенларга жавоб сифатида ишлаб чиқарилувчи ва уларнинг мувозанати иммун жавоби ва паталогик жараённи кечишида муҳим аҳамиятга эга бўлган яллиғланишни қўзғатувчи цитокинлар ИЛ-6, ИЛ-1 бета ва яллиғланишга қарши ИЛ-10 ишлаб чиқарилиши ҳам ўрганилди. Цитокинларни мувозанатда ўрганиш яллиғланиш жараёнини баҳолаш учун энг объектив ёндашув ҳисобланади. Олинган натижалар 3-жадвалда келтирилган.
ИЛ-1-бетта организмда яллиғланиш реакциясини биринчилардан бўлиб қўзғатувчи асосий цитокин ҳисобланади. ИЛ-6 кеч яллиғланиш цитокини бўлиб, унинг кўпайган қиймати деярли ҳар доим узоқ давом этган яллиғланиш реакцияси ёки ножўъя натижаси сифатида талқин қилинади. ИЛ-10 – яллиғланишга қарши медиатор бўлиб, у яллиғланишни кучайтирувчи цитокинлари қийматининг ортишига жавобан иммун ҳужайралари томонидан ишлаб чиқарилади. Иммун тизимининг асосий цитокинларини ўрганиш бўйича олинган натижалар 3-жадвалда келтирилган. Жадвалда ЎРВИ билан касалланган беморларнинг маълумотлари келтирилган.
Шундай қилиб, ЎРВИ билан касалланганлар гуруҳида ИЛ-1 бетанинг спонтан ишлаб чиқариш даражаси ортиб, у 23,45±4,25 пг/мл ташкил этди. Адабиёт маълумотларига кўра, бундай спонтан ишлаб чиқариш ҳақиқат бўлиб, у зардоб концентрациясидан ишончли тарзда ажралиб туради. Рутан 100 мг билан суткалик инкубация қилингандан сўнг ИЛ-1 бета даражаси аҳамиятсиз камайди ва 18,5±0,19 пг/мл ни ташкил этиб, ички назорат қийматидан 1,3 баравар камайган. Бундай тадқиқот натижалари шуни кўрсатадики, Рутан 100мг яллиғланишни чақириш хусусиятига эга эмас. Рутан 250мг билан суткалик инкубациядан сўнг ИЛ-1 бета миқдори сезиларли даражада пасайиб, 12,3±1,5 пг/мл ни ташкил этиб, ички назорат қийматидан 1,9 баравар камайган. Демак, Рутан 250 мг ИЛ-1 бета функциясига катта таъсир кўрсатиб, унинг ишлаб чиқарилишини тўхтатган.

3-жадвал

Рутан препаратининг цитокин-ишлаб чиқариш фаоллиги, M±m

Қиймат	Ички назорат (спонтан ишлаб чиқариш)	Рутан 100 мг таъсирида индукция	Рутан 250 мг таъсирида индукция
ИЛ-1 бета, пг/мл	23,45±4,3	18,5±0,19*	12,3±1,52*
ИЛ-6, пг/мл	14,8±3,1	6,82±1,42*	7,3±1,80*
ИЛ-10, пг/мл	35,9±2,72	46,82±1,50	59,8±3,62*

Изоҳ: * - гуруҳлар ўртасидаги фарқларнинг ички назоратга нисбатан ишончлилиги

Яллиғланиш цитокини бўлган ИЛ-6 ишлаб чиқаришни ўрганишда ҳам худди юқоридагидек холат кузатилди. Таҳлил шуни кўрсатдики, Рутан 100мг дозада ИЛ-6 ишлаб чиқаришни қўзғатмаган ва шу билан иммун ҳужайралар фаоллашувини чақирмаган, шунинг учун у цитокин бўронига сабаб бўлмаган. Рутан 100 мг таъсирида ИЛ-6 ишлаб чиқиш 2,2 баравар, Рутан 250 таъсирида эса 2 баравар камайган. Бундан кўриш мумкинки, иммун ҳужайралари инкубация қилинганда ИЛ-6 ишлаб чиқиш Рутан 100 мг таъсирида бирмунча кам бўлган. Шундай қилиб, Рутан 100 ва 250 мг ИЛ-6 ишлаб чиқишни чақирмай ва аксинча, ИЛ-6 ишлаб чиқиш камайиб, Рутан таъсирида иммун ҳужайралар фаоллашувининг кузатилмагани буни яна бир бор тасдиқлаган.

Шуни ҳам таъкидлаш лозимки, Рутаннинг ушбу хусусияти коронавирус инфекциясига қарши антивирал терапияни тайинлашда, айниқса, яллиғланиш медиаторлари етарлича кучли ишлаб чиқарилиши билан кечувчи паталогик инфекцион жараённинг илк босқичларида кенг миқёсда ўрганилиши ва қўлланилиши мумкин.

Шунингдек, яллиғланиш жараёнларини тўхтаиш учун ТХ2 ҳужайралар томонидан ишлаб чиқилувчи ИЛ-10 яллиғланишга қарши цитокини ҳам ўрганилди. Олинган натижалар 3-жадвалда келтирилган. Жадвалдан шуни кўриш мумкинки, ЎРВИ билан оғриган беморларда ИЛ-10 нинг спонтан ишлаб чиқариш бироз кўпайган, яъни ИЛ-1бета, ИЛ-6 каби яллиғланиш қўзғовчи цитокинларнинг юқори қийматларига жавобан ИЛ-10 ишлаб чиқариш миқдори ортган.

- 100 ва 250 мг таъсирида ИЛ-10 ортиши ва яллиғланиш жараёнининг сусайиши кузатилган. 100 мг таъсирида ИЛ-10 ишлаб чиқариш 1,3 баравар, Рутан 250мг таъсирида эса 1,7 баравар ортган. Бу Рутан 250 мг препарати ўткир респиратор вирусли инфекция яллиғланиш жараёнларини аниқ бостириш хусусиятига эга эканлигини кўрсатади. Ушбу таҳмин олинган натижаларга индивидуал ёндашган холда кўпроқ хажмдаги материалларни ўрганишни талаб қилади. Ушбу соҳадаги дастлабки изланишлар натижасида, ИЛ-10 нинг яллиғланишга қарши таъсирга эга эканлигини билганимиз холда, унинг ишлаб чиқилиши яллиғланишни қўзғовчи цитокинлар ишлаб чиқарилишини камайтириши ва шу билан иммун тизимининг гиперфаоллашувини блоклаши, ИЛ-1 бета ва ИЛ-6 яллиғланиш медиаторларининг сусайтириши мумкин деб таҳмин қилишимиз мумкин.

Яна шуни таъкидлаш лозимки, соғлом одамлар гуруҳида ИЛ-10 ишлаб чиқиш ўзгармаган, ИЛ-10 миқдори фақат ЎРВИ га чалинган беморлар гуруҳида юқори бўлган. Бундан келиб чиққан холда коронавирус инфекциясида Рутан препаратининг яллиғланишга қарши самарага эга эканлиги тўғрисида гапира оламиз ва бу йўналишда кейинги тадқиқотларни давом эттирамиз.

Шундай қилиб, ўтказилган тадқиқот натижалари шуни кўрсатдики, CD38+ лимфоцитларда барвақт активация маркери экспрессиясининг меъёрга яқин бўлган энг кам қиймати ЎРВИ билан касалланганлар гуруҳида Рутан 250мг билан инкубация қилинганда кузатилди. Худди шу холат ўткир коронавирус инфекцияси фонида ҳам характерли бўлиши мумкин.

Рутан 100 ва 250 мг таъсирида ИФН-альфа индукцияси кузатилмади, бу Рутан препарати интеферон индукциялаш хусусиятига эга эмаслидан далолат беради. Бундан ташқари чет давлатларда олиб борилган тадқиқотларда Рутан вирусга қарши тўғридан-тўғри фаоллик кўрсатган. Интерферон гаммани ўрганиш натижасида аҳамиятсиз ишлаб чиқариш аниқланди, эҳтимол бу бу ўсиш тенденциясини бу холатда вирусга қарши иммунитетнинг рағбатлатирилиши ҳисобига вирусга қарши таъсир самараси деб ҳисобласа бўлади. Рутан 100мг таъсирида ИЛ-1 бета ишлаб чиқиш 1,3 марта, Рутан 250 мг – 1,9 марта бостирилгани препаратни, айниқса 250 мг дозада яллиғланишга қарши таъсирга эга эканлигини яна бир бор тасдиқлади.

Рутан 100 мг ИЛ-6 ишлаб чиқарилишини индукцияламаган, иммун ҳужайраларини фаоллаштирмаган ва шу орқали цитокин бўрони чақирмаган. Рутан 100 ва 250 мг таъсирида ИЛ-6 ишлаб чиқиш 2 марта камайган. ИЛ-10 ишлаб чиқариш Рутан 100 мг таъсирида -1,3 марта, Рутан 250 мг таъсирида- 1,7 мартага ортган, бу эса Рутанни айниқса 250 мг дозада яллиғланишга қарши хоссага эгалигидан далолат беради.

Ушбу аниқланган маълумотлар фақат ЎРВИ билан касалланганлар гуруҳида кузатилган. Шу муносабат билан биз коронавирус инфекциясида Рутан препаратининг яллиғланишга қарши таъсири ҳақида гапира оламиз ва ушбу йўналишдаги кейинги тадқиқотларни давом эттирамиз.

ЎзР ФА иммунология ва инсон геномикаси
Институти фундаментал иммунология лабораторияси
е.и.х. ИСМАИЛОВА А.А.