

THE HISTORY OF BIOCHEMISTRY

УДК 577.352

doi: <https://doi.org/10.15407/ubj88.05.116>

ВИНАХІДНИЦЬКА ДІЯЛЬНІСТЬ ВІДДІЛУ МОЛЕКУЛЯРНОЇ ІМУНОЛОГІЇ ІНСТИТУТУ БІОХІМІЇ ІМ. О. В. ПАЛЛАДІНА НАН УКРАЇНИ

*50-річчю наукової і науково-організаційної діяльності
С. В. Комісаренка присвячується*

В. М. ДАНИЛОВА, Р. П. ВІНОГРАДОВА, С. Г. ТОРХОВА

*Інститут біохімії ім. О. В. Палладіна НАН України, Київ;
e-mail: valdan@biochem.kiev.ua*

Молекулярна імунологія – один із найважливіших напрямів сучасної біології і прямий «нащадок» традиційної імунології – виникла, сформувалась і зробила найважливіші відкриття за останні 50 років. Це наука інтегральна, оскільки використовує досягнення і методи біохімії, біофізики, молекулярної біології, генетики, інших наук і спрямована на вивчення однієї з головних систем організму – імунної, основним призначенням якої є підтримка антигенної стабільності внутрішнього середовища організму. Імунна система бореться з численними захворюваннями в організмі людини і тварин, як з інфекційними, так і з новоутвореннями, і ще частіше попереджає чи перешкоджає їх виникненню. Водночас порушення імунних реакцій є причиною багатьох захворювань, і практично кожна хвороба впливає на стан імунітету організму, який, у свою чергу, визначає перебіг захворювання.

Імунологія в певному сенсі є унікальною медико-біологічною наукою, тому що має власні високочутливі і високоспецифічні методи та власні об'єкти дослідження різного рівня організації (органи, тканини, клітини та молекули, що беруть участь у реалізації функцій імунної системи) [1].

Поза тим, дослідження в галузі фундаментальної імунології є також конче важливими і для інших біологічних наук, оскільки

дають унікальну можливість ученим моделювати і вивчати на різних рівнях організації (молекулярному, субклітинному, клітинному і міжклітинному, а також органному) загальні біологічні процеси, пов'язані з диференціацією, проліферацією та смертю клітин, з механізмами між- і внутрішньоклітинної сигналізації, організацією геному в клітині, зрештою вивчати структурну організацію та функціонування макромолекул. Недарма колишні аксіоми – один протеїн кодується одним геном, а потім – один поліпептидний ланцюг кодується одним геном – були спростовані саме завдяки молекулярній імунології, коли було показано, що молекула імуноглобулінів (а також окремо важкий і легкий ланцюг молекули імуноглобулінів) кодуються декількома генами.

Саме цією найскладнішою, найцікавішою та вкрай важливою наукою й зацікавився **Сергій Васильович Комісаренко**, який першим в Україні започаткував науковий напрям досліджень – *молекулярну імунологію*, створивши в Інституті біохімії ім. О. В. Палладіна НАН України спочатку лабораторію імунохімії, а потім – відділ з однойменною назвою.

Восени цього року виповнюється **50 років** з того часу, коли молодий Сергій Комісаренко переступив поріг Інституту біохімії АН України, пройшов всі щаблі наукової кар'єри від аспіранта до директора Інституту і разом із започаткованим ним науковим напрямом досліджень ство-



Зав. відділу молекулярної імунології, академік НАН і НАМН України С. В. Комісаренко в лабораторії. Київ, 2016 р.

рив потужну наукову школу, представники якої, в свою чергу, стали відомими вченими як у нашій країні, так і за її межами.

Про наукові і науково-практичні здобутки співробітників цього відділу, але трохи ширше ніж заявлено у назві, йдеться у представленій статті.

Відділ молекулярної імунології бере свій початок із вересня 1975 р., коли за ініціативою акад. М. Ф. Гулого з відділу біосинтезу та біологічних властивостей білка на чолі з канд. біол. наук. С. В. Комісаренком (тепер – акад. НАН та НАМН України, д-р біол. наук, проф.) було виділено групу з восьми науковців і допоміжного персоналу, яка набула статусу **лабораторії імунохімії**. У 1982 р. лабораторію було перетворено у **відділ молекулярної імунології**, керівником якого з того часу і дотепер є Сергій Васильович.

Лабораторія була створена після повернення С. В. Комісаренка із наукового відрядження до Франції, де він працював у 1974-1975 роках в лабораторії імуноцитохімії Відділення молекулярної біології Інституту Пастера у Парижі під керівництвом професора С. Аврамеаса. Слід згадати, що саме Стратіс Аврамеас та Жозе Уріель першими в світі у 1966 році використали ензим *пероксидазу* для імунохімічного (імуоензимного) аналізу. Напевне, імуопероксидазний метод

визначення антигенів для діагностики є зараз найпоширенішим у світі.

Як розповідав Сергій Васильович, він звернув увагу на роботи С. Аврамеаса з використання пероксидази та синтезу імуосорбентів за допомогою глутарового альдегіду, які стали класичними, ще у 1970 році, коли, після закінчення аспірантури, він за порадою свого вчителя – академіка М. Ф. Гулого – зацікавився імунологією, зокрема механізмами синтезу антитіл. Для цього потрібно було володіти сучасними на той час методами імуохімічного аналізу. Спроби самостійно зв'язувати комерційну пероксидазу угорської фірми «Реанал» з антигенами чи антитілами за опублікованими методами були невдалими. Як потім з'ясувалося, ця пероксидаза була дуже низької якості і не могла бути використана без додаткової хроматографічної очистки. Саме в цей час до Києва, на запрошення АН УРСР, приїхав один з найвідоміших імунологів у світі, винахідник імуоелектрофорезу, академік Французької медичної академії П'єр (Петро Миколайович) Грабар. Петро Миколайович був добре знайомий з академіками АН УРСР Р. Є. Кавецьким та В. П. Комісаренком і був вчителем С. Аврамеаса. У розмові із Сергієм Комісаренком він зацікавився його планами з вивчення синтезу імуоглобулінів і сприяв згоді С. Аврамеаса прийняти С. Комісаренка на стажування в його



Колектив відділу молекулярної імунології. Київ, 1982 р. Зліва направо: 1-й ряд: О. М. Буханевич, Н. В. Доценко, Н. П. Карлова, М. П. Дмитренко; 2-й ряд: Г. М. Фомовська, М. В. Скок; 3-й ряд: С. В. Василенко, Н. В. Канівець, М. Г. Журавський, Д. І. Лукінов, С. В. Комісаренко, О. Б. Ткачук, Т. В. Горошнікова, Г. Г. Гайворонська

лабораторію. За рік стажування С. В. Комісаренко повністю опанував імунопероксидазні методи виявлення синтезу неспецифічних і антипероксидазних антитіл лімфоцитами та/або плазматичними клітинами, синтезував різноманітні імуносорбенти, зокрема на основі кон'югованого із сефарозою конканаваліну А, а також прослухав поглиблений курс імунології Пастерівського інституту, який викладали найкращі французькі та іноземні лектори. Знання згаданого курсу та лекції з молекулярної біології в Колеж де Франс дозволили йому оволодіти найсучаснішими знаннями з молекулярної та клітинної імунології. Наприкінці свого перебування в Інституті Пастера він запропонував своєму вчителю – С. Аврамеасу, а потім і директору Інституту – лауреату Нобелівської премії Жаку Моно виконати проект із вивчення зв'язку між генами, які кодують синтез імуноглобулінів, та структурою імуноглобулінів, що мало вказати на походження специфічності антитіл. Ж. Моно виявив неабиякий інтерес і запропонував С. Комісаренку грант на два роки (з продовженням) для виконання проекту спільно з професором П'єром Вассалі із Женевського університету. На жаль, із сімейних обставин

Сергій Васильович мав повернутися додому і проект не був виконаний. Але методи, які було опановано ним в лабораторії імуноцитохімії в Парижі, надалі було успішно використано в Інституті біохімії в Києві. Тільки угорську пероксидазу фірми «Реанал» довелося додатково очистити іонобмінною хроматографією до RZ не менше 3,0. Така високоочищена пероксидаза дозволила у співробітництві з лабораторією проф. К. П. Зака з Інституту ендокринології і обміну речовин МОЗ УРСР проводити маркування різних популяцій лімфоцитів та передбачувано стовбурових клітин [2], а також разом із групою д-ра біол. наук В. О. Майського (Інститут фізіології ім. О. О. Богомольця АН УРСР) вивчати ретроградний аксонний транспорт пероксидази в нервовій системі [3].

Але повернемося до початку створення лабораторії імунохімії. З огляду на те, що вивчення структурних генів, які кодують структуру імуноглобулінів, у Києві було неможливим (хоча невдалі спроби були), кілька років поспіль головними науковими напрямками досліджень лабораторії були: *вивчення механізмів імунотропної і протипухлинної дії фосфорорганічних похідних неорганічного*

пірофосфату та розроблення і використання методів імунохімічного аналізу протеїнів для подальшого визначення механізмів молекулярного розпізнавання антигенів імунною системою організму.

Дослідження імуотропної дії бісфосфонатів, що проводилися вченими відділу під керівництвом Сергія Комісаренка, були чи не найпершими в світі. Відділ був також серед тих, хто першим у СРСР застосував імуоензимний аналіз, протокову цитофлуориметрію, гібридну технологію одержання моноклональних антитіл та імунохімічний аналіз протеїнів. Згодом імунохімічні методи дослідження стали основою для створення у відділі високочутливих та високоспецифічних імунодіагностикумів, які конче необхідні для медицини, ветеринарії, для розвитку імунобіотехнології та моніторингу стану довкілля тощо.

У полі зору науковців відділу було також дослідження молекулярних механізмів активації лімфоцитів: було встановлено, що активація лімфоцитів, яка пов'язана з їх проліферацією, залежить від іонів кальцію і супроводжується зміною активності ензимів перетворення аденозину та його похідних у клітині.

У відділі було створено низку протипухлинних імуотоксинів, виявлено негативний вплив низьких доз радіації на систему природного імунітету в ліквідаторів аварії на Чорнобильській АЕС, досліджено імунохімічну структуру нейротоксину апаміну, цитохрому с, молекул фібриногену та фібрину на різних стадіях його полімеризації, дифтерійного токсину і його рецептора, мікобактерій, що спричиняють туберкульоз людини і тварин; досліджено також роль протеїназоактивованих рецепторів (ПАР) та нікотинових ацетилхолінових рецепторів лімфоцитів, природу поліреактивних імуноглобулінів (ПРИГ) та багато іншого.

Але про все по порядку. Спочатку зупинимось на дослідженні механізмів імуотропної та протипухлинної дії фосфорорганічних похідних неорганічного пірофосфату.

Вивчення механізму біологічної дії фосфатних аналогів неорганічного пірофосфату. Похідні неорганічного пірофосфату (PP_i) – фосфонати і бісфосфонати – було вибрано для вивчення, виходячи з того, що PP_i бере участь у великій кількості найважливіших ен-

зиматичних реакцій як продукт або субстрат реакції, а також входить до структури багатьох метаболітів. Зв'язки, що не гідролізуються (P-C у фосфонатів або P-C-P у бісфосфонатів), та потужні комплексоутворювальні властивості фосфонатів дозволяли сподіватись на можливість пертурбації метаболічних шляхів у клітинах за їх допомогою. Хоча в літературі були дані, що бісфосфонати не впливають на активність низки ензимів, зокрема на активність пірофосфатази, співробітниками відділу було показано, що бісфосфонати – ефективні інгібітори неорганічної пірофосфатази і деяких інших ензимів, де учасником реакції є неорганічний пірофосфат [4].

Ученими відділу було досліджено біологічну активність, механізм дії та залежність активності від структури бісфосфонатів – на той час нового класу лікарських препаратів, встановлено імуномодуляторну активність метиленбісфосфонової кислоти (МБФК). Отже, введення МБФК тваринам спричинювало в них гальмування як біосинтезу антитіл до Т-залежних антигенів, так і реакцій клітинної імунної відповіді. Гальмувався біосинтез антитіл IgM-, IgE- та, особливо, IgG-класу. Вплив МБФК, що не призводив до змін у субпопуляційному складі лімфоцитів, очевидно, був зв'язаний з її ефектом на функціональну активність Т-клітин. Інші бісфосфонати, що вивчалися (окси- та амінопохідні МБФК), не виявляли імуномодуляторної дії, хоча й були потужними комплексоутворювальними речовинами. МБФК та її структурні аналоги – оксіетиліденбісфосфонова (ОБФК), аміно-МБФК та фосфоноцтова кислоти не були цитотоксичними й не гальмували проліферацію лімфоцитів у культурі у відповідь на стимуляцію мітогенами. МБФК істотно не впливала на синтез лімфоцитами певних інтерлейкінів. Вона не проходила крізь плацентарний бар'єр та не справляла ембріотоксичної дії. Використовуючи ^{14}C -МБФК було виявлено тропізм МБФК до лімфоїдних клітин і визначено кінетичні та термодинамічні параметри транспортування МБФК у клітини. Це дозволило вважати, що МБФК потрапляє в лімфоцити кооперативно, завдяки градієнту концентрації, за механізмом полегшеної дифузії із транспортером. Транспортування гальмується PP_i та ОБФК, але не неорганічним фосфатом (P_i), і не залежить

від інтенсивності синтезу АТР у клітині. Було розраховано та визначено типи структурних комплексів, у складі яких бісфосфонати містяться в клітині, та проаналізовано ті види комплексів з біологічно важливими металами, які можуть взаємодіяти з ензиматичними системами клітини.

Використовуючи сполуки, які відрізняються кількістю фосфорильних груп, типом зв'язку (Р-С, Р-О чи Р-Н) або зарядом та розміром молекули, було досліджено механізм впливу бісфосфонатів та фосфонатів на активність низки ключових ензимів перетворення PP_i або тих молекул, до складу яких входить PP_i . Дійшли висновку, що основою імуномодуляторної дії фосфонатів, передусім МБФК, є її тропізм до лімфоцитів. Перенесення до лімфоцитів та накопичення в них МБФК призводить до гальмування неорганічної пірофосфатази та підвищення локальної концентрації PP_i , а згодом – до появи різнолігандних комплексів бісфосфонатів з іонами двовалентних металів і з PP_i та до зміни активності деяких ензимів, зокрема, наприклад, ДНК-залежної РНК-полімерази II, ензимів метаболізму пуринів тощо.

Результати цих наукових досліджень стали основою докторської дисертації Сергія Васильовича Комісаренка «Биологическое действие бисфосфонатов и регуляция иммунного ответа».

Слід зазначити, що С. В. Комісаренко ніколи не уникав (і не уникає й нині) можливості скористатися результатами своїх фундаментальних досліджень з практичною метою. Так, на прохання Інституту м'ясо-молочної промисловості він провів імунохімічне дослідження протеїнів молока, що було використано під час створення сучасних молочних сумішей для годування немовлят. У складі колективу авторів цього винаходу С. Комісаренко у 1979 році був відзначений Державною премією УРСР.

На основі бісфосфонатів у відділі було створено декілька прототипів медичних препаратів: синтезовано *поліуретанову композицію*, яка правила за імобілізований імуномодулятор із місцевим протизапальним та імуносупресивним ефектом; запропоновано новий протипухлинний препарат «*Мебіфон*», який успішно пройшов клінічні випробування, і зараз його випускає фірма ВАТ «Фармак» у Києві [5–7].



Клінічні дослідження показали, що застосування оригінального вітчизняного бісфосфонату значно покращує якість життя хворих онкологічного профілю з метастазами в кістках пухлин різної локалізації, зменшує інтенсивність болю і підвищує фізичну активність пацієнтів. Встановлено лікувальний ефект препарату за метастазів у кістках хворих на рак молочної та передміхурової залоз. Доведено, що препарат сприяє нормалізації вмісту кальцію в сироватці крові хворих із метастазами в кістках і зменшенню проявів гемотоксичності у разі його включення в схеми хіміотерапії [8]. На спосіб лікування хворих із злоякісними пухлинами молочної залози у 2001 р. одержано патент [9].

Із використанням імуноглобулінів (антитіл) та фосфорорганічних комплексонів (амінобісфосфонатів) було синтезовано *імуновекторні молекули*, які зберігали комплексоутворювальні властивості бісфосфонатів та активність антитіл. Такі конструкції пропонуються для радіоімунолокалізації антигенів, що було перевірено за зв'язування імуновекторних молекул із радіоактивними Са та Тс [10, 11]. У наведених дослідженнях брали участь д-р біол. наук Н. М. Гула, канд. біол. наук Г. Г. Гайворонська, М. Г. Журавський, Н. П. Карлова, І. М. Колеснікова, О. П. Пенезіна, Г. М. Фомовська та інші. Препарати фосфонатів було синтезовано в Інституті органічної хімії НАН України за участю канд. хім. наук А. М. Борисевича, професорів П. С. Пелькіса і М. О. Лозинського та в Інституті молекулярної біології ім. В. О. Енгельгардта АН СРСР за участю канд. хім. наук Н. Б. Тарусової та чл.-кор. АН СРСР Р. М. Хомутова. Синтез поліуретанової

композиції проводили у співпраці з групою науковців Інституту хімії високомолекулярних сполук НАНУ під керівництвом д-ра біол. наук Г. О. Пхакадзе [12, 13].

У відділі було також створено імуновекторні молекули – *імунотоксини* для вибіркового руйнування клітин-мішеней. З метою їх створення проводили кон'югацію антитіл проти поверхневих антигенів пухлинних клітин (або вторинних антиімуноглобулінових антитіл) із цитотоксичними антибіотиками – *блеоміцетином та стрептонегрином*, які було синтезовано проф. М. Н. Преображенською в Науково-дослідному інституті з дослідження нових антибіотиків АМН СРСР (нині – РАМН). *Ефективність специфічних імунотоксинів у культурі виявилась у 25 разів вищою за «чистий» токсин.*

Дослідження імунохімічної структури протеїнів і пептидів. Водночас у відділі проводили дослідження імунохімічної структури протеїнів і пептидів, які були першими в СРСР і які почалися з аналізу *нейротоксину апаміну* – одного з компонентів бджолоїної отрути, який було отримано від А.І. Мірошникова з Інституту біоорганічної хімії АН СРСР (нині – академік РАН, а інститут має назву Інститут біоорганічної хімії ім. М. М. Шемякіна та Ю. А. Овчинникова РАН). *Апамін* – це пептид із 18 амінокислот із двома дисульфідними зв'язками, молекулярною масою 2 038 Да, з амідованою С-кінцевою карбоксильною групою гістидину, який безпосередньо діє на центральну нервову систему.

Використовуючи радіоактивний *апамін* та його модифіковані похідні в радіоімуноному аналізі, С. В. Комісаренко та С. В. Василенко встановили, що імунодомінантний епітоп локалізовано навколо 13- та 14-го аргінінів апаміну, і він практично збігається з нейротоксичним сайтом молекули. Тому антиапамінові антитіла можуть бути протекторними у разі отруєння апаміном. *Електронно-імуноцитозиматичним методом було з'ясовано, що апамін зв'язується із сарколемою гладеньких м'язів, а використання радіоактивного апаміну показало, що зв'язування із синапсами головного мозку є специфічним і оборотним.*

Імунохімічний аналіз *цитохрому с* коня було проведено М. В. Скок та Е. М. Кавуном з використанням пептидів та синтетичного *цитохрому с*, одержаних в Московському інституті

тонких хімічних технологій під керівництвом чл.-кор. АН СРСР Р. П. Євстигнєєвої. Було ідентифіковано антигенні детермінанти цитохрому *с*, що розпізнаються антитілами кроля, та ті, що розпізнаються мишачими антитілами різних класів у динаміці імунної відповіді. Також було показано, що IgG-антитіла до цитохрому *с* розпізнають конформаційні антигенні детермінанти на всій молекулі та на її довгих фрагментах 1–65 і 1–80, тоді як Т-клітини розпізнають тільки короткі синтетичні пептиди: 1–13, 14–22, 46–56, 57–77 і 92–104. Пептиди ефективніше за нативний протеїн стимулювали проліферацію клітин, що свідчило про необхідність процесингу цитохрому *с* для його імунного розпізнавання [14].

Вкрай цікавим, на думку С. В. Комісаренка, було дослідити чи відбувається зміна специфічності антитіл проти *цитохрому с* у динаміці імунної відповіді на цей протеїн, тобто чи не починають утворюватися антитіла проти інших антигенних детермінант на цитохромі. Якщо зміна відбувається, то вона могла бути або за рахунок іншого розпізнавання антигену, або комплексів антиген–антитіла проти *цитохрому с* антигенпрезентуючими клітинами. На жаль, за браком пептидів *цитохрому с* в ті роки цю гіпотезу перевірити не вдалося.

З огляду на те, що *цитохром с* виходить із мітохондрій за ішемії, логічним було припустити, що він з'являється в кровотоці, зокрема за інфаркту міокарда, і може стимулювати утворення специфічних антитіл, які, в свою чергу, впливатимуть на його перебіг. *У зв'язку з цим у відділі молекулярної імунології було розроблено метод визначення цитохрому с і специфічних до нього антитіл в крові людей. Метод було успішно апробовано в Інституті кардіології ім. М. Д. Стражеска для діагностики ускладненого перебігу інфаркту міокарда. На цей метод одержано авторське свідоцтво [15].*

Роботи з аналізу *апаміну* та *цитохрому с* були першими в СРСР роботами з імунохімічного дослідження протеїнів і пептидів.

Молекулярні механізми активації лімфоцитів. Ще із середини 1970-х років С. В. Комісаренко вважав, що з'ясування молекулярних механізмів активації лімфоцитів (*сигналіngu в лімфоцитах*) є одним із найважливіших у молекулярній імунології. У зв'язку з цим виникли такі важливі пи-

тання: якої природи сигнали, що передаються з поверхні імункомпетентних клітин від антигенрозпізнавальних рецепторів або коштимуляторних рецепторів у клітину? які механізми і які молекули беруть участь у подальшій передачі сигналу (чи сигналів) усередині клітини до її ядра? як активується експресія відповідних генів під час активації лімфоцитів, і яким чином запускаються альтернативні шляхи проліферації або диференціації лімфоцитів?

Справді, на початку 1980-х років природа і механізм передачі сигналів від плазматичної мембрани імункомпетентної клітини до її ядра були невідомі. Самостійно в Києві вирішити це було неможливо. Але в той час, в 1981 р., канд. біол. наук С. В. Комісаренку трапилась нагода стажування у протираковому центрі імені Слоан-Кеттерінга в Нью-Йорку в лабораторії Дж. Хеддена, який разом з Р. Коффі відомий своїми роботами з вивчення ролі cGMP в активації лімфоцитів. В цій лабораторії Сергій Васильович швидко опанував методи кількісного аналізу cGMP і cAMP та складну методіку визначення активності cGMP-залежної протеїнкінази в лімфоцитах, а також ознайомився із гібридною технологією, яка вперше була запропонована в 1975 році. Крім того, в лабораторії Збігнева Дарзінкевича він розпочав дослідження активації лімфоцитів новим на той час методом – протоковою цитофлуориметрією. Опановані С. В. Комісаренком під час стажування у США методи пізніше було впроваджено у відділі молекулярної імунології в Києві.

Продовження робіт з урахуванням наявних методичних можливостей, в тому числі протокової цитофлуориметрії (з 1984 р. у відділі був єдиний в СРСР активно функціонуючий протоковий цитофлуориметр), відбулося у відділі молекулярної імунології в Києві у 1980-ті роки.

Так, із застосуванням протокової цитофлуориметрії було досліджено параметри клітинного циклу в синхронізованих клітинах (на моделі мишачої плазмацитоми МОРС-21), а радіоімунним методом виміряно вміст cAMP і cGMP за різних фаз клітинного циклу. Доведено, що додавання екзогенних дибутирильних похідних cAMP і cGMP та модуляторів обміну cAMP (інгібітора фосфодіестерази cAMP й активатора аденілатциклази) в середовище культивування не спричинює перерозподіл лімфоцитів за фазами циклу. Тобто зміна рівня

циклічних нуклеотидів не є основною регуляторною системою клітинного циклу в лімфоцитах. Ці дослідження було проведено в межах кандидатської дисертації Д. І. Лукінова та за участю канд. біол. наук С. М. Тихонової.

Дуже важливі дослідження імунної системи було проведено у військових – ліквідаторів аварії на Чорнобильській АЕС (1986 р.). Використовуючи найсучасніші методи дослідження, вже наприкінці 1986 р., всупереч офіційній в ті роки концепції, Сергій Васильович із колегами вперше довів, що невеликі дози сумарної радіації (25 бер) істотно пригнічують систему природного імунітету, зокрема знижують кількість та активність природних клітинкілерів, які відповідають за протипухлинний та противірусний імунітет. З використанням протокового цитофлуориметру та моноклональних антитіл проти антигенів диференціації лімфоцитів людини було проаналізовано кількісний склад популяції лімфоцитів у ліквідаторів, а потім – за допомогою сортувального пристрою – цитофлуориметра – певні лімфоцити було виділено в очищеному вигляді для подальшої електронної мікроскопії в лабораторії професора К. П. Зака в Інституті ендокринології і обміну речовин МОЗ УРСР. Було знайдено суттєві морфологічні зміни у природних клітинах-кілерах.

Додатково, щоб відкинути можливий вплив стресу, співробітниками відділу на базі Інституту експериментальної терапії в Сухумі було проведено дослідження на мавпах. Опромінення мавп дозами, розрахованими відповідно до аналогічних доз для людей (25 бер, або 250 мілізівертів), підтвердили результати щодо існування радіаційного імунодефіциту, який С. В. Комісаренко дуже влучно назвав тоді «чорнобильським СНІДом».

Життя підтвердило правомірність та своєчасність проведеної роботи, яка стала першим і об'єктивним дослідженням імунної системи людей, опромінених під час аварії на ЧАЕС. Результати цих досліджень було враховано під час роботи ліквідаторів та відселення мешканців із забруднених територій у безпечні райони країни.

З огляду на існування тяжких імунодефіцитних станів в умовах недостатності ензимів обміну пуринів (в першу чергу – аденозиндезамінази) та пуриннуклеотидів у

лімфоцитах і на те, що ці ензими відіграють важливу роль у клітинному метаболізмі взагалі, Сергій Васильович створив у відділі спеціальну групу і запросив до її керівництва досвідченого біохіміка з відділу біохімії м'язів – канд. біол. наук **Миколу Петровича Дмитренка**. Цією групою (М. П. Дмитренко, О. М. Буханевич, Т. В. Горошнікова), а також аспірантом В. Ю. Уманським було досліджено різні властивості *аденилатциклази*, *аденозиндезамінази*, *5'-нуклеотидази*, *АМР-аміногідролази*, *аденилаткінази* в лімфоцитах тимуса і селезінки без стимуляції та за впливу поліклональних активаторів. Внаслідок цієї роботи у 1988 р. М. П. Дмитренко захистив дисертацію «*Обмен аденозина и адениннуклеотидов и его регуляция в лимфоцитах*» на здобуття наукового ступеня д-ра біол. наук.

Впровадження гібридної техніки одержання моноклональних антитіл. Використання сучасних методів молекулярної і клітинної імунології, протокової цитофлуориметрії дало можливість не тільки проводити кількісний аналіз антигенів, локалізувати антигени й антитіла на поверхні клітин та у внутрішньоклітинних структурах, але й виділяти окремі клітини для подальшого їх аналізу та клонування. Водночас стало зрозумілим, що проведення високоспецифічного і точного імунохімічного аналізу є практично неможливим без культури клітин і використання моноклональних антитіл (мкАТ).

С. В. Комісаренко, один із перших в СРСР, увів у дослідження гібридну технологію для одержання *моноклональних антитіл*.

Для цього у відділі під керівництвом старшого наукового співробітника, канд. біол. наук **Ірини Миколаївни Колеснікової** було створено «гібридну» групу, яка одержала велику кількість клонів гібридом – продуцентів мкАТ. Зокрема, було виділено та проаналізовано декілька *антитіл* з унікальними властивостями: *проти окремих ланцюгів інсуліну людини, пероксидази з хрону, цитохрому с коня, нейроспецифічних протеїнів, проти унікальної антигенної детермінанти очищеного протеїнового деривату туберкуліну мікобактерій великої рогатої худоби, проти різних епітопів молекул плазмінотену, фібриногену і/або фібрину та їхніх фрагментів* тощо.

Наведені вище дослідження заклали основу для імунобіотехнологічних методів зі створення імунодіагностичних та імунобіологічних препаратів.

Вже в середині 80-х років ХХ ст. у відділі сформувалося декілька груп, які працювали над різними об'єктами.

Імунохімічний аналіз протеїнів системи з'єднання крові. Після повернення із відрядження до Франції у 1975 р. С. В. Комісаренко запропонував акад. В. О. Беліцеру, який тоді очолював відділ структури і функції білка, разом провести імунохімічне дослідження системи фібриноген – фібрин. Ідея Сергія Васильовича полягала у застосуванні спочатку моноспецифічних, а потім і мкАТ як молекулярних зондів для дослідження структури *фібрин(огену)*, пошуку неоантигенних детермінант, що експонуються в процесі перетворення *фібриногену* на *фібрин*, виявлення *невідомих центрів полімеризації фібрину* та вивчення молекулярних механізмів цього процесу. Володимир Олександрович дуже зацікавився цією роботою, але з організаційних причин вона не розпочиналась аж до того часу, коли у 1985 р. до відділу молекулярної імунології з відділу структури і функції білка не перейшов канд. біол. наук, ст. наук. співр. **Едуард Віталійович Луговської** (нині – чл.-кор. НАН України, д-р біол. наук, проф.) разом зі своєю групою (інж. Г. К. Гоголінська та С. Г. Дерзська), і до виконання цієї теми не долучилася «гібридна» група на чолі з І. М. Колесніковою (К. Д. Ляшко, Л. М. Литвинова, О. П. Костюченко, Р. В. Ставнійчук).

Об'єднаною групою дослідників було одержано низку мкАТ до «самостійно» виділених фібриногену, фібрину на різних стадіях полімеризації та їхніх фрагментів. Ці антитіла дозволили виявити нові, раніше невідомі, сайти на молекулі фібрину, що беруть участь у його полімеризації, та запропонувати певні механізми полімеризації фібрину [16–18]. Результати цих досліджень захищено патентами [19–22]. Синтез і використання мкАТ для теоретичних досліджень молекулярних механізмів тромботворення, одночасно дозволило знайти і використати ті мкАТ, що з високою специфічністю та афінністю реагували із фібриногеном, розчинним фібрином або димером D фрагмента фібриногену (D-димером), завдяки чому ці



Тест-система імуноензимна «DIA^R-Гемостаз» для одночасного кількісного визначення фібриногену, розчинного фібрину та D-димеру в плазмі крові людини

антитіла було використано з метою розробки імуноензимних тест-систем для визначення зазначених молекулярних маркерів у плазмі крові людини (захищено патентами [23–25].

Роботу в цьому напрямі надалі було продовжено спільно з відділом структури і функції білка, який у 2008 р. очолив Е. В. Луговської і куди з відділу молекулярної імунології було переведено «гібридомну» групу І. М. Колеснікової. Детальніше про цей аспект роботи і його практичну значущість йшлося в статті [26].

Слід зазначити, що за дослідження системи гемостазу людини та створення вітчизняних діагностиків, зокрема за допомогою власно одержаних мкАТ під керівництвом С. В. Комісаренка і Е. В. Луговського, в 2015 р. **групу науковців інституту було відзначено Державною премією України в галузі науки і техніки.**

Дослідження молекулярних механізмів активації лімфоцитів було продовжено у відділі молекулярної імунології групою



Співробітники лабораторії імунології клітинних рецепторів. Київ, 2016 р. Зліва направо: наук. співр. О. Ю. Лихмус, ст. наук. співр. Л. М. Коваль, асп. К. Р. Успенська, зав. лаб. член-кор. НАН України, проф. М. В. Скок

науковців під керівництвом канд. біол. наук **Марини Володимирівни Скок** (нині – член-кор. НАН України, проф.). Слід зазначити, що на базі цієї групи у 2012 р. було створено *лабораторію імунології клітинних рецепторів*, до складу якої в різні часи входили: канд. біол. наук Л. М. Коваль, О. М. Калашник, О. Ю. Лихмус, Г. Л. Гергалова, Ю. І. Петрова, асп. К. Р. Успенська.

Головний об'єкт досліджень групи (далі – лабораторії) – *нікотинові ацетилхолінові рецептори (nAChR)*, експресовані в центральній нервовій системі, в імунних клітинах та на внутрішньоклітинних органелах – мітохондріях, а також *антитіла проти nAChR*, як чинники впливу на nAChR за фізіологічних умов і як інструмент для дослідження.

Вперше в В-лімфоцитах виявлено наявність nAChR. Встановлено, що В-лімфоцити експресують $\alpha 7$ -, $\alpha 4$ - та $\alpha 9$ -вмісні субтипи nAChR, які фізично зв'язані з імунними рецепторами В-лімфоцитів. *Відповідно сигнальні механізми nAChR впливають на виживаність попередників В-лімфоцитів у процесі диференціювання і на їх активацію в процесі розвитку імунної відповіді.* При цьому $\alpha 4$ -вмісні nAChR підтримують активаційні процеси, опосередковані антигенспецифічним рецептором, а $\alpha 7$ -вмісні nAChR, навпаки, пригнічують активацію, опосередковану коstimуляторною молекулою CD40. $\alpha 9$ -Вмісні nAChR виконують «резервну» функцію, частково заміщуючи $\alpha 7$ nAChR за відсутності останнього. $\alpha 7$ -Вмісні nAChR входять до складу імунного синапсу, що утворюється між Т- і В-лімфоцитами в процесі активації. Блокування $\alpha 7$ nAChR антагоністом метиллікаконітином (МЛА) або десенситизація за постійної присутності агоніста призводить до посилення активації В-лімфоцитів та імунної відповіді. **Цю роботу було відзначено премією ім. І. І. Мечникова НАН України в 2012 році.**

Найвища кількість $\alpha 7$ і $\alpha 9$ nAChR спостерігається в В1-лімфоцитах перитонеальної порожнини та В2-лімфоцитах крайової зони селезінки миші, що свідчить про еволюційно древнє походження холінергічної регуляції гуморальної ланки імунітету. Крім того, було показано, що $\alpha 7$ nAChR відіграють важливу роль у діяльності регуляторних В-лімфоцитів (Breg), які складають супресорну гілку гуморальної імунної відповіді, продукуючи протизапальний інтерлейкін-10 (ІЛ-10).

Виявлено, що механізм функціонування $\alpha 7$ nAChR у В-лімфоцитах, на відміну від такого в збудливих клітинах, не потребує відкриття іонного каналу самого nAChR, а опосередкований конформаційними змінами в молекулі рецептора, які відбуваються за зв'язування специфічних лігандів. Зв'язування як агоністів, так і антагоністів $\alpha 7$ nAChR запускає низку внутрішньоклітинних подій, які опосередковано впливають на відкриття депокерованих Ca^{2+} -каналів CRAC, що призводить до підвищення концентрації внутрішньоклітинного Ca^{2+} . Антитіла проти $\alpha 7$ nAChR стимулюють проліферацію В-лімфоцитів миші незалежно від зв'язування CD40, що також свідчить про наявність сигнальних механізмів nAChR, не опосередкованих його іонним каналом. *Таким чином, у В-лімфоцитах $\alpha 7$ nAChR функціонують як метаболічні рецептори, впливаючи на активацію інших рецепторів і каналів [27].*

Дані, одержані в лабораторії, також відкрили новий холінергічний механізм регуляції мітохондріального шляху індукції апоптозу. Функцією nAChR мітохондрій є контроль за утворенням мітохондріальної пори перехідної провідності, яка є джерелом проапоптичних факторів і активних форм кисню, що вивільнюються в цитозоль. Показано, що активація nAChR мітохондрій запобігає відкриттю пори і вивільненню *цитохрому с*.

Подібно до nAChR В-лімфоцитів, механізм впливу nAChR на відкриття мітохондріальної пори не потребує участі його іонного каналу і може бути індукований зв'язуванням специфічних агоністів, антагоністів, алостеричних модуляторів і антитіл.

Останнім часом дослідження співробітників лабораторії спрямовано на визначення походження мітохондріальних nAChR та сигналів для їх доставки в мембрану мітохондрій. Попередні результати дозволяють припустити, що $\alpha 7$ nAChR мітохондрій є продуктом того самого гена, що і nAChR, експресований на плазматичній мембрані. Мітохондріальний $\alpha 7$ nAChR, подібно до відповідного рецептора плазматичної мембрани, містить залишки сілової кислоти, тобто проходить традиційний шлях посттрансляційного глікозилювання в комплексі Гольджі, однак відрізняється від мембранного nAChR за вмістом сілових кислот, фукози і галактози. *Таким чином, сигналом, що спрямовує рецептор на мем-*

брану або в мітохондрії, можуть бути глікани, приєднані до поліпептидного ланцюга [28].

В лабораторії досліджується також роль антитіл проти $\alpha 7$ -субтипу *nAChR* у розвитку нейрозапалення та нейродегенеративних патологій, подібних до хвороби Альцгеймера.

Відомо, що $\alpha 7$ *nAChR* опосередковують протизапальний ефект ацетилхоліну в клітинах моноцитарно-макрофагального походження. В лабораторії імунології клітинних рецепторів виявлено, що хронічне запалення, спричинене регулярними ін'єкціями бактерійного ліпополісахариду (ЛПС) впродовж 5 місяців, призводило до зниження щільності $\alpha 7$ *nAChR* в мозку, накопичення патологічної форми β -амілоїду(1-42) та погіршення епізодичної пам'яті мишей – симптомів, характерних для ранньої форми хвороби Альцгеймера. Подібні симптоми спостерігались внаслідок імунізації мишей позаклітинним доменом $\alpha 7(1-208)$ *nAChR*, що призводило до присутності в крові антитіл проти $\alpha 7$ *nAChR*. Мітохондрії мозку обох груп мишей також містили знижену порівняно з контрольними мишами кількість $\alpha 7$ *nAChR*, накопичували β -амілоїд (1-42) і були чутливішими до апоптогенної дії Ca^{2+} і менш чутливими до нормалізуючої дії агоніста $\alpha 7$ *nAChR*. В обох випадках у мозку мишей спостерігали астроцитоз і підвищений рівень прозапального ІЛ-6. Дійшли висновку про те, що антитіла проти позаклітинних епітопів $\alpha 7$ *nAChR* спричинюють в мозку запалення, яке є достатнім для розвитку нейродегенеративних симптомів хвороби Альцгеймера. У людей із хворобою Альцгеймера (рання форма) було виявлено підвищений рівень автоантитіл проти $\alpha 7$ *nAChR* [29].

У подальшому було показано, що навіть короткостроковий вплив ЛПС протягом трьох днів призводив до зниження експресії $\alpha 7$ *nAChR* на рівні РНК і протеїну в усіх досліджених відділах мозку (фронтальній корі, гіпокампі, стріатумі та мозочку). При цьому в мозку знижувалась експресія та активність ацетилхолінестерази (АХЕ) і підвищувався вміст мікроРНК 132 і 212. Таким чином, протизапальний ефект ацетилхоліну (якому сприяло зниження активності АХЕ) нівелювався зниженням експресії $\alpha 7$ *nAChR*. Антитіла проти позаклітинної частини $\alpha 7$ *nAChR*, введені внутрішньовенно на фоні попередньої ін'єкції ЛПС, проникали до паренхіми мозку, вже почи-

наючи з 15 хв після введення, і накопичувались в усіх його відділах, зв'язуючись з $\alpha 7$ -вмісними клітинами та нервовими волокнами. Введення антитіл не призводило до подальших змін $\alpha 7$ *nAChR* та АХЕ на фоні ЛПС, але запобігало підвищенню вмісту мікроРНК 132 і, особливо 212, які також є частиною протизапальних механізмів. Отже, $\alpha 7$ *nAChR*-специфічні антитіла сприяли розвитку запалення на епігенетичному рівні.

*Одержані в лабораторії результати свідчать про ключову роль запалення та про важливу патогенетичну роль антитіл проти $\alpha 7$ *nAChR* в розвитку хвороби Альцгеймера.*

Від початку 1999 р. у відділі молекулярної імунології активно працює група молодих учених під керівництвом канд. біол. наук **Дениса Володимировича Колиби** (тепер – д-р біол. наук), на основі якої у 2012 р. створено лабораторію імунології, до складу якої входили або входять тепер зав. лаб., д-р біол. наук Д. В. Колибо, канд. біол. наук: С. І. Романюк, А. А. Кабернюк, А. Ю. Лабинцев, Н. В. Короткевич, О. С. Олійник, Т.А. Редчук, К. О. Паливода, аспіранти: К. Ю. Манойлов, О. І. Криніна, Т. О. Чудіна, А. А. Сіромолот.

Наукові дослідження цього колективу від початку було спрямовано, по-перше, на клонування в клітинах *Escherichia coli* генів діагностично значущих протеїнів збудників інфекційних хвороб (насамперед, *туберкульозу і дифтерії*), а, по-друге, – на одержання *рекомбінантних одноланцюгових варіабельних фрагментів антитіл (ScFv-антитіл)* методом фагового дисплея та на вивчення їхніх властивостей і можливостей використання як компонентів діагностикумів.

У подальшому дослідження лабораторії було спрямовано на з'ясування молекулярних механізмів функціонування *дифтерійного токсину* та його рецептора *HB-EGF*, а також на розробку нових імунобіотехнологічних продуктів.

Дифтерійний токсин (ДТ) є основним фактором патогенності збудника дифтерії *Corynebacterium diphtheriae*. Він є унікальним бактеріальним протеїном, який вибірково знищує певні клітинні популяції завдяки чіткій функціональній спеціалізації доменів, що дозволяє використовувати цей токсин в протеїновій інженерії для конструювання рекомбінантних похідних з певними заданими властивостями. Завдяки невеликим розмірам ця молекула становить значний інтерес для ство-



Співробітники лабораторії імунобіології. Київ, 2015 р. Зліва направо: мол. наук. співр. А. Ю. Лабинцев, зав. лаб., д-р біол. наук Д. В. Колибо, пров. інж. К. Ю. Манойлов, мол. наук. співр. Н. В. Короткевич

рення штучних протеїнових молекул із транспортною функцією, наприклад, імунотоксинів.

У лабораторії імунобіології розроблено низку нетоксичних рекомбінантних флуоресцентних похідних ДТ, які можуть бути застосовані: для дослідження рецепторопосередкованого зв'язування і транспортування токсину в клітинах; для визначення рівня експресії на клітинах рецептора ДТ – ргоНВ-EGF; для імунізації та одержання антитіл проти різних частин токсину, а також для розробки діагностичних тест-систем з метою виявлення дифтерійного токсину та антитоксичних антитіл.

ДТ складається із двох субодиниць – А і В. Субодиниця В забезпечує взаємодію з рецептором на поверхні клітини і транслокацію субодиниці А токсину з ендосоми в цитозоль чутливих клітин. *Функціональні аналоги субодиниці В із флуоресцентною міткою є перспективними інструментами для вивчення згаданих вище процесів.* У лабораторії було одержано флуоресцентні аналоги субодиниці В та підтверджено специфіку їх взаємодії з чутливими до дії ДТ клітинами мавпи лінії Vero.

Було запропоновано використовувати флуоресцентні похідні субодиниці В як інструмент для ідентифікації рецептора ргоНВ-EGF на поверхні клітин, а також для вивчення взаємодії і проникнення ДТ в клітину [30].

Субодиниця В не виявляє каталітичної активності. Саме тому вона є нетоксичною

по відношенню до нормальних клітин. Проте, оскільки субодиниця В може блокувати мітогенну активність розчинної форми фактора росту – sНВ-EGF, вона може розглядатися як *потенційний протипухлинний препарат.*

Одним із важливих завдань співробітників лабораторії є розробка нових методів *in vitro* для оцінки кількості токсиннейтралізуючих поліклональних і мкАТ, що дозволило б уникнути використання активного ДТ і токсинчутливих лабораторних тварин. Так, було запропоновано новий метод для виявлення протективних антитіл у сироватці крові, який є різновидом тесту ToBI (*Toxin Binding Inhibition Test* – гальмування зв'язування токсину), який заснований на здатності антитоксичних антитіл інгібувати зв'язування флуоресцентної В-субодиниці токсину із клітинами лінії Vero. *Новий, запропонований в лабораторії, підхід для оцінки антитоксичних антитіл є більш етичним та безпечнішим, і може успішно замінити традиційні методи тестування на тваринах.*

Активна імунізація людей анатоксином широко використовується для профілактики дифтерії, а пасивна імунізація гіперімунною антитоксичною кінською сироваткою – для лікування дифтерії. Проте *дифтерійний анатоксин і кінська антитоксична сироватка* мають низку серйозних недоліків. Тому пошук нових антигенів й антитіл, які можуть ефективно захистити від ДТ, є актуальним за-

вданням імунобіології в боротьбі з дифтерією. Порівнюючи токсиннейтралізуючі властивості антитіл, що з'являються після імунізації лабораторних тварин рекомбінантними субодинамиціями А і В ДТ, співробітники лабораторії продемонстрували здатність субодинамиці В виробляти токсиннейтралізуючі антитіла в лабораторних тварин (кролів і мурчаків), що було підтверджено з використанням внутрішньошкірного і ToBI-тестів, розроблених для цієї мети.

Одержані результати свідчать, що рекомбінантна В-субодинамиця ДТ здатна замінити використання анатоксину для профілактики дифтерії і може бути успішно використана для індукції захисної імунної відповіді проти дифтерії [31].

Дослідження різних штамів *E. coli* – продуцентів рекомбінантних субодинамиць ДТ *Corynebacterium diphtheriae* завершилися одержанням патентів [32–35], які використано під час розробки **імуноензимної тест-системи для контролю протидифтерійного імунітету в популяції**.

Ця система може бути застосована для оцінки рівня антитоксичного імунітету у хворих під час перебігу інфекції, а також для вдосконалення диференційної діагностики дифтерії та моніторингу стану захищеності населення від дифтерії. Розроблена тест-система дає можливість визначити вміст антитіл до кожної із субодинамиць ДТ окремо, що має більш діагностичне значення, аніж дані про вміст антитіл до усєї молекули токсину. Рівень антитіл до В-субодинамиці токсину характеризує протективний імунітет, а наявність антитіл до субодинамиці А свідчить про можливий контакт зі збудником (носіємство або хвороба). Одержані штами *E. coli* K 12 "inv" sbA і sbB – продуценти неактивних субодинамиць А і В ДТ – дають можливість одержати діагностично важливі антигенні субстанції з мінімальними втратами часу, ресурсів і високим виходом цільового продукту.

Адаптування імуноензимних тест-систем для виявлення ДТ і антитоксичних антитіл із протективними властивостями до умов масштабного виробництва проводили разом зі співробітниками акціонерного товариства «Науково-виробнича компанія «Діапроф – Мед» (Київ) шляхом реалізації покращення основних якісних характеристик тест-систем, а саме:

чутливості (здатності виявляти перевищення концентрації досліджуваного маркера в зразках плазми крові) і специфічності (здатності уникати хибнопозитивних результатів під час дослідження зразків плазми крові).

В лабораторії імунобіології відділу молекулярної імунології для розробки імунобіотехнологічних реагентів нового покоління останні 12 років широко використовуються технології фагового дисплея. Так, наївну мишачу бібліотеку одноланцюгових варіабельних фрагментів антитіл (ScFv) було використано для виділення ScFv антитіл, що розпізнають ДТ. Співробітниками лабораторії (канд. біол. наук О. С. Олійник) було створено імунну бібліотеку мишачих генів імуноглобулінів та після одного циклу відбору методом фагового дисплея з неї виділено декілька клонів ScFv антитіл, що розпізнають ДТ. Крім того, було створено наївну бібліотеку генів імуноглобуліну людини, яка дозволила одержати людські ScFv антитіла до ДТ. Також одержано ScFv антитіла до HB-EGF, які у подальшому було застосовано для створення імуноліпосом спрямованої доставки лікарських речовин в пухлини, що надекспресують онко-маркер proHB-EGF.

Гепаринзв'язувальний фактор росту – HB-EGF – належить до родини епідермальних ростових факторів, який синтезується як мембрано-заякорений посередник proHB-EGF, а завдяки дії позаклітинних протеїназ може переходити в розчинну форму фактора – sHB-EGF. Важливою особливістю HB-EGF є його здатність виступати в ролі високоспецифічного рецептора до ДТ, який забезпечує проникнення токсину всередину клітини та реалізацію його цитотоксичної дії. Тому рекомбінантні аналоги цього фактора росту можуть бути перспективним біотехнологічним продуктом під час створення новітніх **імуноензимних тест-систем** для виявлення вмісту протективних протидифтерійних антитіл та/або наявності молекул активного ДТ в біологічних рідинах.

Тому останнім часом співробітниками лабораторії (Д. В. Колибо, С. І. Романюк, Н. В. Короткевич, А. Ю. Лабинцев) було розроблено прототипи імуноензимних тест-систем для визначення вмісту протективних протидифтерійних антитіл і молекул токсину в біологічних рідинах на основі рекомбінантного аналога sHB-EGF людини [36–38].



Імуноензимна тест-система для контролю протидифтерійного імунітету в популяції

З метою оцінки імуногенних властивостей частинок полі(лактид-ко-гліколіду) (PLGA), покритих целобіозою як носіїв антигену для пероральної імунізації, синтезовано два типи частинок, які містили нетоксичну рекомбінантну субодиницю В ДТ. Збільшення концентрації анитоксичних антитіл у крові було виявлено вже після першої імунізації. Результати досліджень показали, що PLGA можна розглядати як потужні компоненти пероральних вакцин [39].

Кожному зрозуміла загроза захворювання на туберкульоз людей і тварин. З огляду на те, що збудник туберкульозу людини *Mycobacterium tuberculosis* може заражати велику рогату худобу, а збудник туберкульозу великої рогатої худоби – *M. bovis* може передаватися від тварин людям і спричинювати в них туберкульоз (особливо за імунодефіцитного стану), у 1988 році керівництво ветеринарної служби УРСР звернулося до С. В. Комісаренка з проханням розробити сучасний, чутливий і специфічний метод виявлення носійства мікобактерій у великої рогатої худоби. З цією метою С. В. Комісаренко запросив до відділу кандидатів біол. наук С. П. Бобровника та К. П. Лященка. Цій групі вдалося очистити певні антигени мікобактерій і порівняти їх у *M. bovis* та *M. tuberculosis*, а також у співпраці з гібридною групою відділу одержати низку відповідних моноклональних антитіл. На жаль, на початку 1990-х ця робота зупинилась – С. В. Комісаренко поїхав до Лондона Послом України у Великобританії, С. П. Бобровник поїхав до Португалії, а К. П. Лященко – до США продовжувати наукову роботу за іншою тематикою [40].

Робота над вивченням збудника туберкульозу продовжилася вже наприкінці 1990-х. Особливо важливими ці дослідження стали у світлі загрозливої епідеміологічної ситуації в Україні на туберкульоз людини і тварин. Тому вивчення імунобіологічних властивостей діагностично важливих антигенів *M. tuberculosis* та *M. bovis* з метою використання їх для діагностики туберкульозу було вкрай актуальним. Вивчення продовжилось вже під керівництвом Д. В. Колиби. Так, в лабораторії імунобіології було вперше одержано рекомбінантні аналоги антигенів цієї бактерії МРТ63, МРТ83, химерного протеїну МРТ63-МРТ83 і розроблено підходи до діагностики туберкульозу з їх використанням.

Виявилось, що протеїни МРТ63 і МРТ83, які є спільними для *M. tuberculosis* та *M. bovis*, є перспективними в розвитку імунодіагностикумів і вакцин через їхню високу імуногенність. Вміст антитіл до туберкуліну РРД і до антигенів МРТ63 і МРТ83 було визначено в експериментальному стаді корів (94 дорослі тварини). Одержані результати підтверджують, що непрямий імуноензимний аналіз із рекомбінантними протеїнами МРТ63 і МРТ83 може бути використаний під час розробки тест-систем для виявлення інфікування туберкульозом корів одночасно із вже звичним туберкуліном РРД. Для підвищення антигенних та імуногенних властивостей цих протеїнів, фрагменти генів МРТ63 і МРТ83 були злиті, при цьому антигенні властивості одержаного рекомбінантного протеїну були співставні з вихідними аналогами. Анти-МРТ83 і анти-МРТ63 сироватки розпізнавали злитий протеїн МРТ63-МРТ83, а, отже, він зберігає антигенні властивості батьківських протеїнів [41, 42]. За цими матеріалами Т. А. Редчук у 2011 р. захистив кандидатську дисертацію.

На основі одержаних даних в лабораторії розроблено **діагностичну тест-систему проти туберкульозу великої рогатої худоби**, яку вже зареєстровано в Україні. Запропонована тест-система для виявлення антитіл до збудження туберкульозу, спричиненого *M. bovis* у великої рогатої худоби необхідна для своєчасного виявлення інфікованих тварин на рівні стада тварин, тварин із латентним перебігом туберкульозу, а також тварин, алергічних до туберкуліну, який є прихованим джерелом збудника хвороби, що важливо під час проведення оздоровчих заходів та для контролю епізоотичної ситуації. Розробка захищена патентом України [43].



Тест-система для виявлення антитіл до *Mycobacterium bovis*

Тест-систему для виявлення антитіл до *M. bovis* «IB-Chem Anti-*Mycobacterium bovis*» зареєстровано в Державній ветеринарній і фітосанітарній службі України (ТУ У 21.2-05417288-001: 2014). Потенційний виробник – ТОВ «Науково-дослідне підприємство «Ветеринарна медицина», Україна, м. Харків.

Врешті-решт, слід наголосити на тому, що одержані співробітниками лабораторії імунобіології результати є **важливим етапом впровадження сучасних методів молекулярної біології в розроблення діагностичних тест-систем нового покоління на основі рекомбінантних протеїнів.**

Співробітники групи під керівництвом д-ра біол. наук **Сергія Панасовича Бобровника** вивчають так звані *поліреактивні імуноглобуліни* (ПРИГ), які здатні неспецифічно зв'язуватись із різноманітними антигенами, зокрема з *автоантигенами*. Дослідження імунохімічних і біологічних властивостей ПРИГ показало, що вони принципово відрізняються від відомих раніше природних антитіл. *Встановлено механізм взаємодії ПРИГ з антигенами, показано, що їхня реактивність може підвищуватись in vivo, що вони можуть опсонізувати бактерії, але сприяють розвитку злякисних пухлин і, можливо, сприяють розвитку атеросклерозу з причини їхньої здатності зв'язуватись з ендотелієм кровоносних судин.* Показано також, що реактивність сироваткових ПРИГ зростає в кілька разів за збільшення віку людей (від 20 до 70 років), що може бути наслідком вікових змін імунної системи організму.

Від січня 2000 р. – до листопада 2010 р. у відділі молекулярної імунології на посаді старшого

наукового співробітника працювала **Наталія Юріївна Євдокимова** (д-р біол. наук з 2009 р.). Її наукові інтереси було зосереджено на з'ясуванні зв'язку фенотипових змін клітин із метаболізмом позаклітинного матриксу (ПКМ). Особливе місце займало вивчення цих питань у контексті розвитку ускладнень *цукрового діабету*. Результати проведених досліджень показали, що підвищений рівень глюкози стимулює збагачення матриксу мезангіальних і ендотеліальних клітин високомолекулярною *гіалуроновою кислотою* (ГК), але механізм цього явища різний для різних типів клітин. У мезангіальних клітинах відбувається активація трансформувального фактора росту $\beta 1$ (TGF $\beta 1$) тромбоспондином-1, що збільшує експресію ГК-синтази 2 і відповідно стимулює синтез гіалуронової кислоти. В ендотеліальних клітинах TGF $\beta 1$ стимулює зв'язування ГК її рецепторами CD44. Дослідження Н. Ю. Євдокимової також було спрямовано на *висвітлення механізмів розвитку ускладнень цукрового діабету*. Так, було показано, що передумовою утворення діабетичних виразок можуть бути природжені зміни системи ГК-CD44 фібробластів, а збільшення рівня глюкози провокує утворення виразок унаслідок акумуляції високомолекулярної гіалуронової кислоти. Ускладнення цукрового діабету можуть також розвиватися через дисбаланс системи коагуляція/фібриноліз і підвищення рівня D-димеру фібрину (DD). Встановлено, що DD знижує вміст антикоагуляційного гепаран сульфату в матриксі ендотеліальних клітин і водночас стимулює активацію TGF $\beta 1$, що призводить до додаткових патологічних змін матриксу. *Було встановлено, що розроблений у відділі протипухлинний препарат «Мєбіфон», про який йшла мова вище, зменшує молекулярну масу гіалуронової кислоти у матриксі фібробластів і ендотеліальних клітин, яка за цукрового діабету збільшена, і тому «Мєбіфон» може бути корисним у лікуванні діабетичних виразок.*

У відділі працює ст. наук. співр., канд. біол. наук **В. А. Галицький**, який проводить самостійну наукову роботу з біоінформатики та епігенетики, пов'язану з проблемами імунології та онкології. *Його теоретичні дослідження мають важливе значення для розуміння молекулярних механізмів канцерогенезу.*

Під керівництвом *Сергія Васильовича Комісаренка* у відділі працює також група з

проблем біобезпеки, біозахисту та біоетики, до складу якої входять кандидати наук Г. Л. Гергалова і Я. С. Максимович.

Куратор групи академік НАН України С. В. Комісаренко очолює Комісію з біобезпеки і біозахисту при РНБО України. Він також щорічно, починаючи з 2005 р., очолює (чи є заступником глави) делегації України на зустрічах в Женеві країн-учасниць Конвенції із заборони біологічної і токсинної зброї (КБТЗ) та делегацію України на зустрічах країн-учасниць Австралійської групи (експортний контроль). Метою роботи з біобезпеки є, в першу чергу, розповсюдження міжнародних і національних інформаційних матеріалів із проблем біобезпеки; проведення міжнародних конференцій, семінарів із біобезпеки і КБТЗ для країн Східної і Південної Європи, а також регіональних семінарів для підвищення обізнаності та освіти з біобезпеки і біозахисту в Україні.

Підсумовуючи наведений матеріал, слід зазначити, що співробітники відділу молекулярної

імунології на чолі з акад. С. В. Комісаренком із самого початку працювали і продовжують плідно працювати над виконанням актуальних і надважливих фундаментальних досліджень, які одночасно спрямовано на розповсюдження добутих знань і на вирішення практичних завдань медицини, харчової, легкої промисловості, а також сільського господарства, тобто *Pro bono hominis* («лат. на благо Людини») – девіз, який сповідує Сергій Васильович впродовж 50 років своєї творчої діяльності. На сьогодні він разом із співробітниками має досить вагомий доробок у вигляді авторських свідоцтв і патентів України та СРСР (понад 80 найменувань). *На жаль, далеко не всі вони впроваджені через низку причин, серед яких головною, на нашу думку, є несприятливий інвестиційний клімат в державі та неготовність бізнесу до розвитку наукоємного сектору економіки.*

У відділі виконано 6 докторських та 28 кандидатських дисертаційних робіт. Відділ має широкі міжнародні наукові зв'язки, зокрема з



Колектив співробітників відділу молекулярної імунології. Київ, 2015 р. Зліва направо: I ряд – ст. наук. співр. Г. Л. Гергалова, мол. наук. співр. Т. В. Горошнікова, наук. співр. О. Ю. Лихмус, інж. I кат. М. О. Декалюк, інж. I кат. О. І. Криніна, ст. наук. співр. О. С. Олійник, інж. I кат. Т. О. Чудіна, зав. лаб. Д. В. Колибо; II ряд – ст. наук. співр. Л. М. Коваль, ст. наук. співр. Я. С. Максимович, ст. наук. співр. М. І. Канюк, зав. відділу С. В. Комісаренко, зав. лаб. О. П. Демченко, інж. I кат. А. А. Сіромолот, пров. інж. К. Ю. Манойлов, інж. I кат. І. Д. Панас; III ряд – зав. лаб. М. В. Скок, мол. наук. співр. К. О. Пиршев

Інститутом Пастера в Парижі та Еллінським Інститутом Пастера в Афінах, з Університетом штату Нью-Йорк Стоун-Брук, з Національним аграрним інститутом INRA в Нанті (Франція), з Пекінським інститутом геноміки Академії наук КНР, з Інститутом біології Академії наук провінції Шандунь КНР та багатьма іншими. За кордоном працюють близько 20 колишніх співробітників відділу.

Робота у відділі молекулярної імунології, де завжди панувала і панує дружня робоча атмосфера, тепер, як і раніше, залишається привабливою для талановитої наукової молоді. Тож найважливіші винаходи і впровадження у Вас, дорогий Сергію Васильовичу, і Ваших учнів ще попереду. Від щирого серця бажаємо вам усім успіхів!

References

1. Komisarenko SV. One hundred years of immunology – science of the future. *Ukr Biokhim Zhurn.* 1982; 54(5): 483-496.
2. Butenko ZA, Zak KP, Komissarenko SV, Gruzov MA, Khomenko BM. Immunoelectron microscopy of the bone marrow mononuclears labelling with rabbit anti-mouse brain serum using peroxidase-anti-peroxidase method. *Blut.* 1983; 47(6): 343-349.
3. Komisarenko SV, Horseradish peroxidase: properties and application in neuro-enzyme assay. / Axonal transport of substances in brain systems. K.: Nauk. Dumka, 1981, 153-161.
4. Gula NM, Komisarenko SV. Inorganic pyrophosphate, its structural analogs and inorganic pyrophosphatase. *Uspechi Biol. Khimii.* 1982; 22: 195-213.
5. A.C. 1512099 SU 4 C01F 9/38, A61K 31/66. Dihydrate disodium salt of methylene bisphosphonic acid exhibits antitumor activity. Komisarenko SV, Karlova NP, Sharykina NI, Kudryavtseva IG, Iezerska LI, Lozynskyi MO, Borisevich AN, appl. 02.02.87.
6. Pat. 12053 UA 4IPC C07F 9/38, A61K 31/66. Dihydrate disodium salt of methylene bisphosphonic acid exhibits antitumor activity. Komisarenko SV, Karlova NP, Sharykina NI, Kudryavtseva IG, Iezerska LI, Lozynskyi MO, Borisevich AN, applicant and patent owner: Palladin Institute of Biochemistry, NAS of Ukraine; Institute of Organic Chemistry, NAS of Ukraine; Institute of Pharmacology and Toxicology, NAMS of Ukraine, No 4239930 SU; appl. 23.03.87; publ. 25.12.96. Bul. No 4.
7. Pat. 40714 A UA 7 C01B15/16, A61K 31/327. Antitumor therapeutic drug (MEBIFON). Komisarenko SV, Sharykina NI, Lozynskyi MO, Karlova NP, Kudryavtseva IG, Kuzmenko IY, Borisevich AN, Iezerska LI, applicant and patent owner: Palladin Institute of Biochemistry, NAS of Ukraine; Institute of Pharmacology and Toxicology, NAMS of Ukraine; Institute of Organic Chemistry, NAS of Ukraine, No 2001074659; appl. 04.07.01; publ. 15.08.01, Bul. No 7.
8. Pivniuk VM, Kasianenko IV, Dehtiar TV, Komisarenko SV, Karlova NP, Oliinichenko IP, Chekhun VF. Domestic medicine from bisphosphonate group in treatment of cancer patients with bone metastases. *Oncology.* 2004; 6(3): 199-202.
9. Pat. 36756 A UA 7 IPC A61K 31/66, A61K 45/05, C07 F 9/38. Method for treatment of patients with breast cancer. Sharykina NI, Kudryavtseva IG, Kasianenko IV, Komisarenko SV, Karlova NP, Lozynskyi MO. Borisevich AM., Chuiko OL, applicant and patent owner: Institute of Pharmacology and Toxicology, NAMS of Ukraine, No 2000020602; appl. 03.02.00; publ. 16.04.01, Bul. No 9.
10. A.C. 1588137 SU 5 G01N 33/53. Method for obtaining labeled antibodies. Komisarenko SV, Fomovska GN, Levchuk OP, Borisevich AN, Lozynskyi MO, Mirian NI, appl. 09.02.88.
11. Pat. 12056 A UA. Method for obtaining labeled antibodies. Komisarenko SV, Fomovska GN, Levchuk OP, Borisevich AN, Lozynskyi MO, Mirian NI, applicant and patent owner: Palladin Institute of Biochemistry, NAS of Ukraine; Institute of Organic Chemistry, NAS of Ukraine, No 4395425 SU, appl. 09.02.88; publ. 25.12.96, Bul. No 4.
12. A.C. 1307814 SU 4 C08K 5/53, C08G 18/06. Polyurethane composition. Komisarenko SV, Karlova NP, Fomovska GN, Borisevich AN, Lozynskyi MO, Pkhakadze GA. appl. 25.12.84.
13. Pat. 12055 UA 4 C08K 5/53, C08G 18/06. Polyurethane composition. Komisarenko SV., Karlova NP., Fomovska GN., Borisevich AN., Lozynskyi MO., Pkhakadze GA., appl. 25.12.84, publ. 25.12.96, Bul. No 4.
14. Komisarenko SV, Vasilieva GA, Evstigneeva RP. Immunochemical analysis of

- equine cytochrome C. Stoichiometry of the interaction and cytochrome C affinity for specific Fab fragments. *Dokl Akad Nauk SSSR*. 1982;264(3):752-755. (In Russian).
15. A.C. 1379739 SU, 4 IPC G01 No 33/49. Method for prognosis of complicated course of myocardial infarction. Komisarenko SV, Skok MV, Gvatua NA, Solonenko IN, Piven VI, (SU) appl. 27.01.86; publ. 07.03.88, Bul. No 9.
 16. Lugovskoy EV, Makogonenko EM, Chudnovets VS, Derzskaya SG, Gogolinskaya GK, Kolesnikova IN, Bukhanevich AM, Sitak IN, Lyashko ED, Komissarenko SV. The study of fibrin polymerization with monoclonal antibodies. *Biomed Sci*. 1991; 2(3): 249-256.
 17. Lugovskoy EV, Chudnovets VS, Makogonenko EM, Derzskaya SG, Gogolinskaia GK, Kolesnikova IN, Mikhailovskaia LI, Komissarenko SV. Study of the polymerization of fibrin using monoclonal antibodies 2D-2A and their Fab-fragments. *Ukr Biokhim Zhurn*. 1995; 67(1): 64-70. (In Russian).
 18. Lugovskoy EV, Komisarenko SV. Monoclonal antibodies as an instrument to study fibrin polymerization. *Bioorg Khim*. 2000; 26(12): 883-891. (In Russian).
 19. Pat. 73232 UA 7IPC C12N5/18, C12P21/08. Strain of animal hybridoma cells *Mus musculus* L. – producing monoclonal antibodies that specifically react with N-terminal epitope of γ -chain of human fibrin D-dimer and fibrinogen D-fragment. Komisarenko SV, Kolesnikova IM, Lugovskoy EV, Liashko KD, Litvinova LM, Kostiuhenko OP, Gogolinska GK, Gritsenko PG, applicant and patent owner: Palladin Institute of Biochemistry, NAS of Ukraine, No 2003077105; appl. 28.07.03; publ.15.06.05, Bul. No 6.
 20. Pat. 73233 UA 7IPC C12N5/18, C12P21/08. Strain of animal hybridoma cells *Mus musculus* L. – producing specific monoclonal antibodies to N-terminal epitope of human fibrinogen B β -chain. Komisarenko SV, Kolesnikova IM, Lugovskoy EV, Liashko KD, Litvinova LM, Kostiuhenko OP, Gogolinska GK, Gritsenko PG, applicant and patent owner: Palladin Institute of Biochemistry, NAS of Ukraine, No 2003077106; appl. 15.06.05; publ. 15.06.05, Bul. No 6.
 21. Pat. 73823 UA 7IPC C12N5/12, C12N5/18, C12N5/20. Strain of animal hybridoma cells *Mus musculus* L. which are cultivated and produce specific monoclonal antibodies to human fibrin D-dimer. Komisarenko SV, Kolesnikova IM, Lugovskoy EV, Liashko KD, Litvinova LM, Kostiuhenko OP, Gogolinska GK, Gritsenko PG, applicant and patent owner: Palladin Institute of Biochemistry, NAS of Ukraine, No 2003076213; appl. 04.07.03; publ. 15.09.05, Bul. No 9.
 22. Pat. 87375 UA IPC (2009) C12N 5/20, C07K 16/36 (2009.01). Strain of animal hybridoma cells *Mus musculus* L. which are cultivated and produce specific monoclonal antibodies to human fibrin. Komisarenko SV, Kolesnikova IM, Lugovskoy EV, Liashko KD, Gritsenko PG, Litvinova LM, Kostiuhenko OP, Lugovska NE, Gogolinska GK, applicant and patent owner: Palladin Institute of Biochemistry, NAS of Ukraine, No a200712284; appl. 06.11.2007; publ. 10.07.2009, Bul. No 13.
 23. Pat. 69283 U UA, IPC A 61K 39/44 (2006.01). Immunoenzyme test-system for quantitative determination of soluble fibrin in human blood plasma. Komisarenko SV, Lugovskoy EV, Kolesnikova IM, Spivak MY, Gritsenko PG, Ganova LO, Lugovska NE, Litvinova LM, Liashko KD, Kostiuhenko OP, Pozniak TA, Gogolinska GK, Kovtoniuk GV, Tereschenko MI, applicant and patent owner: Palladin Institute of Biochemistry, NAS of Ukraine, Zabolotny Institute of Microbiology and Virology, NAS of Ukraine, No u201111736; appl. 05.10.2011; publ. 25.04.2012, Bul. No 8.
 24. Pat. 69284 U UA IPC A 61K 39/44 (2006.01). Immunoenzyme test-system for quantitative determination of D-dimer in human blood plasma. Komisarenko SV, Lugovskoy EV, Kolesnikova IM, Spivak MY, Gritsenko PG, Ganova LO, Lugovska NE, Litvinova LM, Liashko KD, Kostiuhenko OP, Pozniak TA, Gogolinska GK, Kovtoniuk GV, Tereschenko MI, applicant and patent owner: Palladin Institute of Biochemistry, NAS of Ukraine; Zabolotny Institute of Microbiology and Virology, NAS of Ukraine, No u201111736; appl. 05.10.2011; publ. 25.04.2012, Bul. No 8.
 25. Pat. 70456 U UA, IPC A 61K 39/44 (2006.01). Immunoenzyme test-system for quantitative determination of fibrinogen in human blood plasma. Komisarenko SV, Lugovskoy EV, Kolesnikova IM, Spivak MY, Gritsenko PG,

- Ganova LO, Lugovska NE, Litvinova LM, Liashko KD, Kostiuhenko OP, Pozniak TA, Gogolinska GK, Kovtoniuk GV, Tereschenko MI, applicant and patent owner: Palladin Institute of Biochemistry, NAS of Ukraine; Zabolotny Institute of Microbiology and Virology, NAS of Ukraine, No u201114516; appl. 07.12.2011; publ. 11.06.2012, Bul. No 11.
26. Lugovska NE. Inventive activity of the Departments of protein structure and Function, and molecular immunology of the Palladin Institute of Biochemistry of NAS of Ukraine. Part II. National breakthrough in the study and diagnostics of human hemostasis system. *Ukr Biochem J.* 2016; 88(3): 106-118.
 27. Skok MV, Koval LM, Lykhmus OYu., Kalashnyk JM, Gergalova GL, Komisarenko SV. Nicotinic acetylcholine receptors: specific antibodies and function in humoral immunity. *Ukr Biochem J.* 2013; 85(6):134-143.
 28. Lykhmus O, Gergalova G, Koval L, Zhmak M, Komisarenko S, Skok M. Mitochondria express several nicotinic acetylcholine receptor subtypes to control various pathway of apoptosis induction. *Int J Biochem Cell Biol.* 2014; 53: 246-252.
 29. Lykhmus O, Voytenko L, Koval L, Mykhalskiy S, Knolin V, Peschana R, Zouridakis M, Tzartor S, Komisarenko S, Skok M. 27 Nicotinic Acetylcholine Receptor – Specific Antibody Induces Inflammation And Amiloid β 42 Accumulation In The Mouse Brain To Impair Memory. *PLoS ONE.* 2015; 10(3): e 0122706.
 30. Labyntsev AIu, Korotkevych NV, Manoilov KJ, Kaberniuk AA, Kolibo DV, Komisarenko SV. Recombinant fluorescent models for studying the diphtheria toxin. *Bioorg Khim.* 2014; 40(4): 433-442.
 31. Kolibo DV, Labyntsev AIu, Romaniuk SI, Kaberniuk AA, Oliinyk ES, Korotkevych NV, Komisarenko SV. Immunobiology of diphtheria / Recent approaches for the prevention, diagnosis, and treatment of the disease. *Biotechnology.* 2013; 6(4): 43-62.
 32. Pat. 22160 U UA. IPC (2006) A61K 39/44, A61K 47/48, C07K 7/08 (2007.01), C12N 15/11. *Eshcherichia coli* “INV” sbB strain – producing recombinant non-active B subunit of diphtheria toxin *Corynebacterium diphtheriae*. Komisarenko SV, Kolibo DV, Romaniuk SI, Kaberniuk AA, Oliinyk OS, Burkalieva DO, Redchuk TA, applicant and patent owner: Palladin Institute of Biochemistry, NAS of Ukraine, No a200604378; appl. 19.04.2006; publ. 25.04.2007, Bul. No 5.
 33. Pat. 23009 U UA IPC (2006) A61K 39/44, A61K 47/48, C07K 7/08 (2007.01), C12N 15/11. *Eshcherichia coli* “INV” sbB strain – producing recombinant non-active A subunit of diphtheria toxin *Corynebacterium diphtheriae*. Komisarenko SV, Kolibo DV, Romaniuk SI, Kaberniuk AA, Oliinyk OS, Burkalieva DO, Redchuk TA, applicant and patent owner: Palladin Institute of Biochemistry, NAS of Ukraine, No u200604337; appl. 19.04.2006; publ. 25.04.2007, Bul. No 5.
 34. Pat. 84356 UA IPC (2006) A61K 39/44, A61K47/48, C07K 7/08 (2006.01); C12N 15/11. *Eshcherichia coli* K12 “INV” sbA strain – producing recombinant non-active A subunit of diphtheria toxin *Corynebacterium diphtheria* hybridized with polyhistidine tag. Komisarenko SV, Kolibo DV, Romaniuk SI, Kaberniuk AA, Oliinyk OS, Redchuk TA, applicant and patent owner: Palladin Institute of Biochemistry, NAS of Ukraine, No a200701085; appl. 02.02.2007; publ. 10.10.2007, Bul. No 19.
 35. Pat. 84357 UA IPC (2006) A61K 39/44, A61K47/48, C07K 7/08 (2006.01); C12N 15/11. *Eshcherichia coli* K12 “IINV” sbB strain - producing recombinant non-active B subunit of diphtheria toxin *Corynebacterium diphtheria* hybridized with polyhistidine tag. Komisarenko SV, Kolibo DV, Romaniuk SI, Kaberniuk AA, Oliinyk OS, Redchuk TA, applicant and patent owner: Palladin Institute of Biochemistry, NAS of Ukraine, No a20070108; appl. 02.02.2007; publ. 10.10.2008, Bul. No 19.
 36. Korotkevich NV, Kolibo DV, Labyntsev AJ, Romaniuk SI, Komisarenko SV. Obtaining of recombinant human heparin binding EGF-like growth factor and perspectives of its application in biotechnology. *Biotechnologia Acta.* 2010; 3(4): 44-54.
 37. Korotkevich NV, Labyntsev AJu, Kolibo DV, Komisarenko SV. Obtaining and characterization of recombinant fluorescent derivatives of soluble human HB-EGF. *Biotechnologia Acta.* 2014; 7(2): 46-53.
 38. Korotkevych NV, Labyntsev AJu, Manoilov KYu, Krynina OI, Dyachenko LV, Kolibo DV, Komisarenko SV. Cell model for the study of receptor and regulatory functions

- of human proHB-EGF. *Ukr Biochem J.* 2014; 86 (4): 69-78.
39. Chudina T, Labyntsev A, Manoilov K, Kolibo D, Komisarenko S. Cellobiose – coated poly (laetide – co – glycolide) particles toaded with diphtheria toxoid for per os immunization. *Groat Med J.* 2015; 56(2): 85-93.
40. Wiker HG, Lyashchenko KP, Aksoy AM, Lightbody KA, Pollock JM, Komissarenko SV, Bobrovnik SO, Kolesnikova IN, Mykhalsky LO, Gennaro ML, Harboe M. Immunochemical characterization of the MPB70/80 and MPB83 proteins of *Mycobacterium bovis*. *Infect Immun.* 1998; 66(4): 1445-1452.
41. Redchuk TA, Oliinyk OS, Kaberniuk AA, Burkalieva DO, Romaniuk SI, Kolibo DV, Komisarenko SV, Cloning and expression of proteins *Mycobacterium bovis* MPB63 and MPB83 in *Escherichia coli* cells. *Rep Nat Acad Sci Ukraine.* 2007; (9): 161-166.
42. Redchuk TA, Korotkevich NV, Kaberniuk AA, Oliinyk OS, Labyntsev AJ, Romaniuk SI, Kolibo DV, Komisarenko SV. Recombinant chimera protein MPB63–MPB83 as perspective antigen for diagnostics of tuberculosis. *Biotechnology.* 2010;3(5):50-56.
43. Pat. 100065 U UA, IPC G01N 33/49 (2006.01), G01N 33/53 (2006.01), G01N 33/531 (2006.01). Immunoenzyme test-system for detection of antibodies to *Mycobacterium bovis*. Komisarenko SV, Kolibo DV, Oliinyk OS, Redchuk TA, Lugovska NE, Siromolot AA, Stegnii BT, Gerilovych AP, Zavgorodnii AI, Nikolaenko IV, Raievska GE, applicant and patent owner: Palladin Institute of Biochemistry, NAS of Ukraine, No u201413675; appl. 19.12.2014; publ. 10.07.2015, Bul. No 13.

Received 20.09.2016