

МОЛЕКУЛЯРНЫЕ И КЛЕТОЧНЫЕ ОСНОВЫ ИММУНОРЕГУЛЯЦИИ, ИММУНОДИАГНОСТИКИ И ИММУНОКОРРЕКЦИИ (ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ МОДЕЛИ)

КОМПЬЮТЕРНОЕ МОДЕЛИРОВАНИЕ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ АУТОИММУННЫХ РЕАКЦИЙ КАК СПОСОБ ВЫЯСНЕНИЯ МЕХАНИЗМОВ ИДИОТИПИЧЕСКОЙ РЕГУЛЯЦИИ И АКТИВАЦИИ АУТОРЕАКТИВНЫХ ЛИМФОЦИТОВ

Абишева Н.Н., Чалый И.А., Фролов М.Л.

ФГБОУ ВО «Удмуртский государственный университет», Ижевск, Россия

Введение. Иммунная сеть, возникающая на основе идиотип-антиидиотипических (ИАИ) взаимодействий между лимфоцитами, является механизмом специфической регуляции активности лимфоцитов, в том числе аутореактивных. Однако как организована и функционирует иммунная сеть, в частности как контролирует аутореактивные лимфоциты и теряет контроль над ними, остается предметом современных дискуссий (Schulz, 2014; Menshikov, 2015).

Цель. Выяснение механизмов идиотипической регуляции и активации аутореактивных лимфоцитов.

Материалы и методы. Экспериментальные исследования выполнены на модели аутоиммунной гемолитической анемии (АГА) у мышей, так как лимфоциты, специфичные к аутоэритроцитам, и лимфоциты, специфичные к эритроцитам крыс (ЭК) (антиген-индуктор классической модели АГА у мышей), связаны в ИАИ взаимодействиях. АГА у мышей индуцировали введением ЭК и аллогенных эритроцитов. Были исследованы кинетика антител против ЭК и аутоантител против ЭМ в крови мышей, а также уровень эритроцитов в крови в ответ на иммунизацию ЭК или аллоэритроцитами. Теоретические исследования выполнены на компьютерной модели иммунной сети, созданной на основе математической модели иммунной сети (Menshikov, 2015). Компьютерная модель описывает шесть идиотипически связанных клонов, замкнутых в кольцо, один из клонов был задан как аутореактивный.

Результаты. На модели АГА у мышей, вызванной введением ЭК, выявлен феномен опережающей продукции антиидиотипических антител (аутоантител к ЭМ) в ответ на иммунизацию ЭК в относительно низкой дозе. Компьютерная модель иммунной сети, содержащая аутореактивный клон, также показывает, что продукция антиидиотипических антител (аутоантител), опережающая продукцию идиотипических антител (антител к чужеродному антигену), наблюдается в ответ на введение чужеродного антигена в относительно низких дозах. Возможность воспроизведения в компьютерной модели иммунной сети экспериментального феномена указывает на то, что он является универсальным, а также позволяет предполагать меха-

низм данного явления. Причиной опережающей продукции антиидиотипических антител, если они являются аутоантителами, в ответ на введение чужеродного антигена является асимметрия в ИАИ взаимодействиях между аутоклоном и клоном, специфичным к чужеродному антигену-индуктору аутоиммунной реакции, возникающая как результат градиента активационного сигнала, поступающего в пару аутоклон—клон против чужого со стороны аутоантигена. Асимметрия в свою очередь может детерминировать регуляторные свойства клона против чужеродного антигена по отношению к связанному с ним аутоклоном. Обнаружено также, что иммунизация мышей аллоэритроцитами приводит не только к появлению аутоантител к эритроцитам и развитию анемии, но и антител к ЭК. Обращает на себя внимание и необычная кинетика иммунного ответа, вызванного аллоэритроцитами. Выявлено, что продукция антител к ЭК синхронизирована с продукцией аутоантител к эритроцитам и характеризуется прогрессивным ростом. Чтобы выяснить причину появления антител к ЭК и прогрессивной синхронной продукции антител к ЭК и аутоантител в ответ на иммунизацию аллогенными эритроцитами, были проведены исследования на компьютерной модели иммунной сети. Добиться сходства теоретической и экспериментальной кинетики иммунного ответа, вызванного аллоантигеном, не прибегая к прямой активации аутоклона и связанного с ним клона против чужого, который имитирует лимфоциты, специфичные к ЭК, можно только подачей сигнала на клон, находящийся на достаточно удаленном расстоянии от аутоклона. Компьютерное моделирование показало, что активация такого клона приводит к активации всего исследуемого фрагмента иммунной сети. При этом все клоны фрагмента иммунной сети демонстрируют прогрессивный незавершающийся рост активности, что свидетельствует о выходе из зоны толерантности. Данный факт позволяет предполагать, что иммунизация аллоантигенами может вызывать системные хронические аутоиммунные процессы.

Заключение. Неравноценность активационного сигнала, испытываемого аутоклоном и идиотипически связанным с ним клоном против чужеродного антигена, вызывает асимметрию в ИАИ взаимодействиях между этими клонами и может тем самым детерминировать регуляторные свойства клона против чужеродного антигена по отношению к связанному с ним аутоклоном. Возникновение системных хронических аутоиммунных процессов может быть следствием иммунного ответа на антигены, активирующие лимфоциты, специфичность которых сходна, но не идентична специфичности лимфоцитов, регулирующих аутоклоны.

ВЛИЯНИЕ МНОГОКРАТНОЙ ТРАНСПЛАНТАЦИИ ИММУННЫХ КЛЕТОК С ОПРЕДЕЛЕННЫМИ ФУНКЦИОНАЛЬНЫМИ ХАРАКТЕРИСТИКАМИ НА ФУНКЦИОНАЛЬНУЮ АКТИВНОСТЬ ИММУННОЙ И НЕРВНОЙ СИСТЕМ РЕЦИПИЕНТОВ

Аникеева О.С., Маркова Е.В.

ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии», Новосибирск, Россия

Введение. Ранее нами был продемонстрирован феномен и механизмы направленной регуляции поведенческих реакций у половозрелых экспериментальных животных трансплантацией иммунных клеток с определенными функциональными характеристиками, а также возможность формирования определенного стереотипа поведения у половозрелых животных путем многократной трансплантации иммуноцитов, проведенной в ювениальном периоде онтогенеза.

Цель. Исследование механизмов влияния многократной трансплантации иммунных клеток с определенными функциональными характеристиками на уровень основных регуляторных цитокинов в головном мозге и селезенке животных-реципиентов в сопоставлении с интенсивностью иммунного ответа и уровнем сформированного ориентировочно-исследовательского поведения.

Материалы и методы. Исследование выполнено на мышцах-самцах (СВАхС57BL/6)F1 в количестве 280 особей, которым, начиная с 4-5-недельного возраста (животные-реципиенты), проводилась трехкратная внутривенная трансплантация спленоцитов от сингенных доноров 3-месячного возраста с оппозитными (активным и пассивным) типами ориентировочно-исследовательского поведения. Контрольной группе животных вводилась среда RPMI-1640 в аналогичных условиях эксперимента. У животных-реципиентов и мышей контрольной группы по достижении половозрелого возраста проводилось исследование поведения в тесте «открытое поле», определение содержания ряда регуляторных цитокинов в головном мозге и селезенке методом иммуноферментного анализа и определение интенсивности гуморального и клеточного иммунного ответа.

Результаты. Ранее нами было показано, что мышца-самцы СВАхС57BL/6)F1 с оппозитными типами поведения различны также по функциональной активности клеток иммунной системы. В настоящем исследовании продемонстрировано, что трехкратная трансплантация спленоцитов от доноров с оппозитными типами поведения сингенным реципиентам в ювенильный период их развития вызывает у последних направленное изменение параметров ориентировочно-исследовательского поведения, сопровождаемое модуляцией содержания цитокинов в селезенке и головном мозге и интенсивности иммунного ответа.

В случае трансплантации спленоцитов от доноров с активным типом поведения в группе реципиентов в половозрелом возрасте регистрировалось увеличение доли животных с активным типом поведения относительно контрольной группы (28,4% vs 11,7%; $p = 0,003$), что ассоциировалось с более высоким содержанием у реципиентов IL-10 в лизатах селезенки (26,1 [5,03÷68,3] vs 3,2 [0,12÷6,9] pg/ml; $p = 0,035$) и повышением интенсивности иммунного ответа. В частности, высота реакции ГЗТ у мышей-реципиентов и в контрольной группе животных

составляла 38,2 (30÷47,4) и 23,8 (12,25÷30,8) соответственно; интенсивность гуморального иммунного ответа, оцененная по относительному числу антителообразующих клеток селезенки (АОК), у указанных групп мышей также повышалась (101,3 [60,2÷184,9] vs 42,7 [14,9÷45,5]).

В группе реципиентов, подвергнутых трехкратной трансплантации спленоцитов от доноров с пассивным типом поведения, регистрировалось увеличение доли животных с аналогичным донорам пассивным типом поведения: 36,6 % vs 23,4% относительно группы контроля ($p = 0,05$), что сопровождалось более высоким содержанием в лизатах головного мозга реципиентов IFN γ (2205(2095,5÷2322,5) vs 1975,8 (1832,4÷2103,4) pg/ml; $p = 0,023$) и TNF α (41,7±[0,91÷141,9] vs 0,0±[0,0÷25,9] pg/ml; $p = 0,05$) относительно соответствующих показателей в контрольной группе животных. Со стороны иммунного ответа у животных-реципиентов отмечалось снижение высоты реакции ГЗТ (15,85 [13,6÷20] и 23,8 [12,25÷30,8] относительно контрольной группы мышей) при повышении интенсивности гуморального иммунного ответа (относительное число АОК селезенки составляло у животных реципиентов и мышей контрольной группы соответственно 71,4 [46,8÷102,3] vs 42,7 [14,9÷45,5]).

Заключение. Таким образом, представленные результаты свидетельствуют о модулирующем влиянии многократной трансплантации иммунных клеток с определенными функциональными характеристиками, проведенной в ювенильный период развития экспериментальных животных, на функциональную активность иммунной и нервной систем реципиентов половозрелом возрасте.

ИЗМЕНЕНИЕ ИММУНОЛОГИЧЕСКИХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ ПРЕДОПРЕДЕЛЯЕТ ВОЗНИКНОВЕНИЕ РАКА МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ В СПОНТАННОЙ МЫШИНОЙ МОДЕЛИ

Аронов Д.А., Моисеева Е.В.

Институт биоорганической химии им. академикова М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова, Москва, Россия

Введение. Рак молочной железы (РМЖ) является наиболее распространенным онкологическим заболеванием у женщин. Персональное предсказание времени возникновения РМЖ может существенно облегчить раннюю диагностику, способствуя снижению смертности. Например, в модели Гейла прогноз строится на основании данных анамнеза жизни женщины с учетом наличия мутаций BRCA1/2 и других известных генов, определяющих врожденную предрасположенность к развитию РМЖ. Однако существующие в клинической онкологии модели по-прежнему не позволяют даже приблизительно предсказать возраст, в котором у данной женщины возникнет РМЖ. Отдельного внимания заслуживает прогностический потенциал показателей иммунной системы: для ряда субпопуляций клеток иммунной системы (ИС) пациентов с РМЖ описаны как про-, так и противоопухолевые эффекты. Имеются данные о связи инфильтрации РМЖ лимфоцитами Treg с плохим прогнозом, а цитотоксическими Т-лимфоцитами (ЦТЛ) – с благоприятным (в зависимости от типа РМЖ, возраста пациента и пр.). Однако влияние уровня/дисбаланса отдельных компонентов ИС на время клинического проявления рака по-прежнему не описано: невозможно выявить момент инициации РМЖ у человека, а стандартные (в том чис-

ле и генномодифицированные) мышинные модели, как правило, не отражают последовательную динамику естественных патофизиологических процессов в момент зарождения, промоции и прогрессии опухолевого роста. Линия мышей BLRB конвенционального разведения характеризуется высокой частотой естественно возникающего (спонтанного) РМЖ у самок по мере старения. Проведенный ранее патоморфологический анализ позволил выявить в данной линии мышей наличие всех основных типов РМЖ человека, а также этапы прогрессии от гиперплазии до карциномы *in situ* и инвазивного РМЖ (как лобулярного, так и протокового). Ранее было выявлено сходство состава лейкоцитарных инфильтратов мыши в этой модели и пациентов с РМЖ.

Цель. Оценить прогностический потенциал иммунологических показателей крови, измеренных до возникновения опухоли в спонтанной мышинной модели РМЖ человека BLRB.

Материалы и методы. У интактных самок BLRB ($n = 81$) нашей коллекции в возрасте от 27 до 99 недель (средний возраст $55,2 \pm 2,0$) были прижизненно взяты образцы крови из ретроорбитального синуса в объеме 200 мкл. Методом проточной цитометрии (FACSCalibur, BD Biosciences, США) был измерен уровень 11 основных показателей ИС крови: лимфоцитов (CD45^{high}SSC^{low}), моноцитов (F4/80+SSC^{int}), нейтрофилов (CD11b⁺F4/80^{neg}SSC^{int}), эозинофилов (F4/80+SSC^{high}), CD4⁺ Т-хелперов, CD8⁺ЦТЛ, CD19⁺В-лимфоцитов, NK1.1⁺NK-лимфоцитов, NK1.1⁺CD3⁺NK-Т лимфоцитов, CD4⁺CD25⁺ активированных (акт.) Т-хелперов, CD8⁺CD25⁺ акт. ЦТЛ. Далее в течение 7 месяцев ежедневно оценивали выживание стареющих самок, ежедневно индивидуально проводили пальпацию, регистрируя появление новых РМЖ. Статистическую значимость различий оценивали в программе STATISTICA 10 (StatSoft, США) по U-критерию Манна–Уитни, связь между параметрами оценивали по коэффициенту корреляции Спирмена.

Результаты. Спустя 7 месяцев РМЖ был выявлен у 21/81 самок (26%), 37/81 самок (46%) погибли без клинических признаков РМЖ и 23/81 самок (28%) были живы без РМЖ. Изначальный уровень моноцитов в крови выживших без РМЖ самок был ниже уровня у погибших самок ($p = 0,02$), так и у самок группы с РМЖ ($p = 0,04$). Изначальный уровень Т-хелперов в крови выживших без РМЖ самок был выше, чем у самок с РМЖ ($p = 0,04$). Однако не было обнаружено статистически значимых различий между группой погибших без РМЖ самок и группой самок с РМЖ. Далее мы обнаружили достоверную связь 9 из 11 измеренных показателей с возрастом самки на момент забора крови ($p < 0,05$): уровень лимфоцитов, эозинофилов, Т-хелперов, акт. Т-хелперов, НК-клеток снижался, а уровень нейтрофилов, ЦТЛ, акт. ЦТЛ и В-лимфоцитов повышался с возрастом. Обнаруженный у самок BLRB по мере старения иммунологический дисбаланс послужил основанием для разделения исходной популяции самок на условно «молодых» (от 27 до 55 нед., в среднем $42,0 \pm 1,4$ нед., $n = 45$) и «старых» (от 56 до 99 нед., средний возраст $71,2 \pm 2,1$ нед., $n = 36$) и рассматривать эти две группы отдельно. Оказалось, что у «молодых» самок с РМЖ изначально уровень НК-клеток был ниже, чем у погибших без РМЖ ($p = 0,009$) и выживших без РМЖ ($p = 0,032$). У «старых» самок с РМЖ обнаружили сочетание изначально низкого уровня В-лимфоцитов с высоким уровнем Т-хелперов, в то время как у погиб-

ших без РМЖ оба параметра были низкие ($p = 0,02$), а у выживших без РМЖ – высокие ($p = 0,011$).

Выводы. 1) Иммунологический дисбаланс усиливался по мере старения еще до возникновения РМЖ. 2) У относительно «молодых» и более «старых» самок прогностическим потенциалом в крови обладают разные иммунологические показатели. 3) Только стратифицируя самок по возрасту, удалось выявить, какие параметры ИС определяют появление спонтанного РМЖ в модели BLRB.

ВЛИЯНИЕ ВРЕМЕНИ ЭКСПОЗИЦИИ С БЕТА-ЭНДОРФИНОМ НА СЕКРЕТОРНУЮ АКТИВНОСТЬ СПЛЕНОЦИТОВ И МАКРОФАГОВ У МЫШЕЙ

Баева Т.А., Гейн С.В.

ФБГНУ «Институт экологии и генетики микроорганизмов» УрО РАН, Пермь, Россия

Бета-эндорфин (ВЕ) – представитель эндогенной опиоидной системы, активно участвующий в регуляции функций иммунной системы. Это короткоживущее пептидное соединение, оказывающее непродолжительные биологические эффекты. Большой интерес представляет наличие у ВЕ опосредованных, отсроченных по времени эффектов на функциональную активность клеток иммунной системы. Одним из механизмов опосредованных эффектов ВЕ может являться модуляция продукции гормонов гипоталамо-гипофизарной оси, в частности, кортикостерона. **Целью** настоящей исследования являлось изучение влияния ВЕ на уровень кортикостерона в плазме периферической крови мышей, секрецию IL-2, IL-4 и IFN γ мышинными спленоцитами, а также продукцию IL-1 β и IL-10 перитонеальными макрофагами *in vivo* через 1 час и через 6 ч после введения пептида.

Материалы и методы. Исследования были выполнены на беспородных мышках-самцах массой 22–25 грамм. В экспериментах использовали ВЕ (Skypek Laboratories, США), который вводили однократно внутривентриально в дозах от 100 до 0,0005 мкг/кг массы животного. Животным контрольной группы вводили эквивалентный объем 0,9% NaCl. Одну половину животных выводили из эксперимента через 1 час, а вторую через 6 часов после введения ВЕ. Выделение и культивирование спленоцитов и перитонеальных макрофагов осуществляли по стандартным методикам. Каждая культура содержала 1×10^6 клеток в 1 мл полной культуральной среды, которую готовили *ex tempore* на основе среды RPMI 1640 с добавлением 10 mM HEPES, 2 mM L-глутамин, 100 мкг/мл гентамицина, меркаптоэтанол (10^{-3} М) и 10% эмбриональной телячьей сыворотки. В качестве митогена для спленоцитов использовали конканавалин А (КонаА) в концентрации 20 мкг/мл, а для макрофагов – опсонизированный зимозан (ОЗ) в концентрации 150 мкг/мл. Культивирование осуществляли во влажной атмосфере с 5% CO $_2$ при 37 °С в течение 24 (для IL-2, IL-1 β , IL-10) или 48 (для IFN γ и IL-4) часов. Концентрацию кортикостерона определяли методом конкурентного твердофазного иммуноферментного анализа с помощью коммерческой тест-системы Enzo (США). Количественное определение цитокинов в супернатантах клеточных культур проводили методом твердофазного иммуноферментного анализа с помощью наборов для мышей по методике, предложенной производителем. Полученный материал обрабатывали с помощью однофакторного дисперсионного анализа для непарных данных. Статистическую значимость раз-

личий между группами оценивали с помощью критерия наименьшей значимой разницы (LSD-тест) Фишера.

Результаты и обсуждение. Установлено, что ВЕ угнетал продукцию про-(IL-1 β) и противовоспалительных (IL-10) факторов, наиболее выражено – в нестимулированных культурах за 1 час до выведения животных из эксперимента. Так, введение ВЕ за 1 час до выведения животных из эксперимента приводило к угнетению только спонтанной продукции IL-1 β макрофагами в дозах 100, 0.01, 0.0005 мкг/кг. Аналогичный эффект пептид оказывал в отношении спонтанной секреции IL-10, активными оказались дозы 1 и 0, 01 мкг/кг. При введении пептида за 6 часов до забоя активность проявила дозировка 1 мкг/кг, которая приводила к угнетению продукции IL-1 β и IL-10 в стимулированных культурах макрофагов. В культурах, стимулированных Кон А наблюдалось усиление продукции IL-4 – как через 1 ч, так и через 6 ч после инъекции ВЕ. На спонтанную продукцию IL-4 спленоцитами ВЕ не оказывал значимого влияния. В работе не было выявлено эффекта пептида на Кон А – индуцированную продукцию IL-2, независимо от времени введения. В то же время было зарегистрировано разнонаправленное влияние ВЕ на уровни IL-2 в спонтанных культурах макрофагов: в группе животных, которым пептид вводили за 1 час до забоя, наблюдалось угнетение секреции IL-2, а через 6 ч после введения – стимуляция. Продукция IFN γ как в спонтанных, так и в стимулированных клеточных культурах статистически значимо не изменялась под воздействием ВЕ. Было отмечено, что концентрация кортикостерона в плазме крови интактных мышей под воздействием ВЕ не изменяется как в ранние, так и в поздние сроки после введения пептида, что, в свою очередь, свидетельствует об отсутствии опосредованности эффекта пептида через продукцию кортикостерона. Таким образом, ВЕ играет важную роль в регуляции функций клеток адаптивного и врожденного иммунитета и, независимо от времени воздействия, усиливает продукцию спленоцитами IL-4, угнетает продукцию IL-1 β и IL-10 макрофагами перитонеальной полости. С другой стороны, направленность эффектов ВЕа на секрецию IL-2 зависит от продолжительности действия пептида. Данные эффекты не связаны с изменением уровня кортикостерона в плазме крови экспериментальных животных.

РОЛЬ ЦИТОКИНОВ И ХЕМОКИНОВ В ТРАНСЭНДОТЕЛИАЛЬНОЙ МИГРАЦИИ НК-КЛЕТОК ПРИ БЕРЕМЕННОСТИ

Баженев Д.О.¹, Соколов Д.И.^{1,2}, Сельков С.А.¹

¹ ФГБНУ «Научно-исследовательский институт акушерства, гинекологии и репродуктологии им. Д.О. Отта», Санкт-Петербург, Россия

² ГБОУ ВПО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург, Россия

НК-клетки являются ведущей популяцией иммунных клеток в зоне маточно-плацентарного барьера. Они обладают фенотипическими и физиологическими особенностями, поэтому их выделяют в отдельную субпопуляцию – децидуальных НК-клеток. Ряд данных указывает на то, что пул этих клеток формируется из НК-клеток периферической крови, которые мигрируют в зону маточно-плацентарного кровотока. Однако до сих пор остается малоизученным вопрос о том, какие факторы направляют миграцию НК-клеток.

Цель. Изучить миграцию НК-клеток через эндотелий в присутствии цитокинов и секреторных продуктов плаценты (СПП) 1-го и 3-го триместров.

Материалы и методы. Клетки линии EA.hy 926 вносили в верхнюю камеру поликарбонатной вставки (диаметр пор 8 мкм) для 24-луночных планшетов, инкубировали 24 часа. Затем в верхнюю камеру вносили НК-клетки линии NK-92MI. В нижнюю камеру вносили кондиционированные среды из-под плаценты и цитокины: IL-10 (100 Е/мл), SDF-1 (100 Е/мл), инкубировали 24 часа. Затем НК-клетки из нижней и верхней камеры обрабатывали антителами к CD45. Абсолютный подсчет количества мигрировавших в нижнюю камеру НК-клеток измеряли на проточном цитофлуориметре FACSCantoII (BD, США).

Результаты. Установлено, что цитокин IL-10 увеличивал количество мигрировавших НК-клеток через монослой эндотелия в 1,2 раза. Хемокин SDF-1 увеличивал количество мигрировавших клеток в 2,5 раза. В присутствии кондиционированных сред плаценты 1-го и 3-го триместров количество мигрировавших НК-клеток снижалось в 2,2 и 1,9 раза соответственно.

Выводы. SDF-1 может выступать в качестве хемоаттрактанта для НК-клеток. IL-10, концентрация которого в зоне маточно-плацентарного контакта возрастает, также усиливает миграцию НК-клеток.

МАРКЕРЫ ПОВРЕЖДЕНИЯ НЕРВНОЙ ТКАНИ И ВОСПАЛЕНИЯ ПРИ ТРАНЗИТОРНОМ НАРУШЕНИИ КРОВООБРАЩЕНИЯ СЕТЧАТКИ: ВОЗМОЖНОСТИ МЕДИКАМЕНТОЗНОЙ КОРРЕКЦИИ

Балацкая Н.В., Киселева Т.Н., Чудин А.В.,
Андрюшин А.Е.

ФГБУ «Московский научно-исследовательский институт глазных болезней им. Гельмгольца»
Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

Введение. Ретинальная ишемия – частая причина значительного снижения и потери зрения, развивающаяся на фоне сосудистых заболеваний (оптические нейропатии, окклюзии ретинальных сосудов, диабетическая ретинопатия, глаукома и т. д.). Транзиторные нарушения кровообращения глаза включают два периода – отсутствие кровотока (ишемия) и его восстановление (реперфузия), которые являются частью одного патологического процесса – ишемии-реперфузии (И/Р). Известно, что активные формы кислорода, образующиеся в результате И/Р, запускают каскад воспалительных иммуномедиаторов, миграцию лейкоцитов в очаг воспаления, способствующих дальнейшему повреждению тканей. Поэтому фармакологическая модуляция реперфузии может улучшить функциональное состояние сетчатой оболочки и последующее клиническое течение. В настоящее время в качестве одного из возможных терапевтических агентов рассматривается антиоксидант ресвератрол, терапевтический эффект которого уже был продемонстрирован в ряде экспериментальных работ.

Цель. Анализ динамики маркеров повреждения нервной ткани и воспаления в раннем и позднем постишемическом периоде в ходе терапии ресвератролом при моделировании И/Р сетчатки в эксперименте.

Материалы и методы. Исследование проведено на 15 крысах (30 глаз) породы Wistar (в возрасте от 3 до 5 мес.) при общей (принятой в лабораторной практике), а также местной анестезии 0,4% р-ром оксибупрокаина. Моделирование односторонней И/Р сетчатки проводилось путем однократного субконъюнктивального введения в левый

глаз 0,2 мл 4*10⁻⁶ М раствора эндотелина-1 фосфатном буфере (0,05 М, рН = 7,4 по ранее предложенному нами методу. Животных, которым моделировали одностороннюю И/Р, разделили на две группы: I-ю группу составили 5 крыс (10 глаз), II-ю – 5 животных (10 глаз), получавших ресвератрол с питьевой водой (сут. доза – 20 мг/кг) в течение 30 дней. III-я – контрольная группа включала 5 грызунов (10 глаз). Материалом иммунологического исследования служили образцы сыворотки крови (СК; n = 20) и тканевые гомогенаты комплекса сетчатка-хориоидея (ТК; n = 20) крыс. Содержание глиального кислого фибриллярного белка (GFAP), моноцитарного хемоаттрактантного протеина-1 (MCP-1) в тест – пробах определяли методом твердофазного иммуоферментного анализа (ИФА) помощью тест-систем, разработанных Cloud-Clone Corp. (США), произведенных USCN Life Science Inc. (КНР) на спектрофотометре – ридере для микропланшет Labsystems Multiskan® PLUS (Финляндия) при длине волны 450 нм.

Результаты. Анализ GFAP и MCP-1 представлен в таблице. В группе животных на 3 сутки ИР наблюдалось статистически значимое повышение уровня MCP-1 в ТК и СК (p < 0,05) с максимальным усилением воспалительного ответа к 7 суткам (повышение содержания в ТК в 5,5 раз (p < 0,001) и незначительным снижением концентрации цитокина к 30 суткам И/Р. Динамика GFAP в системном кровотоке была аналогична таковой MCP-1 и свидетельствовала о повышении проницаемости гематофтальмического барьера, а выявленные повышенные концентрации GFAP соответствовали данным исследованиям апоптоза, указывали на деструктивные процессы в нервной ткани. Применение ресвератрола в суточной дозе 20 мг/кг в течение во II группе грызунов способствовало снижению уровня маркера воспаления MCP-1 в ТК и концентрации GFAP в СК в раннем и позднем постинфекционном периоде (p < 0,05).

Выводы. Данные исследования динамики маркеров повреждения нервной ткани и воспаления GFAP и MCP-1 в раннем и позднем постинфекционном периодах в ходе терапии ресвератролом демонстрируют защитные и противовоспалительные свойства антиоксиданта в отношении тканей глаза (ретинопротекторные, нейропротекторные) при моделировании И/Р в эксперименте у крыс.

ТАБЛИЦА. СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ДИНАМИКА GFAP И MCP-1 ТК И СК У КРЫС ПРИ МОДЕЛИРОВАНИИ И/Р: БЕЗ ПРИЕМА (I ГРУППА), НА ФОНЕ ПРИЕМА РЕСВЕРАТРОЛА (II ГРУППА) И ГРУППЫ ИНТАКТНЫХ ЖИВОТНЫХ (M±m) (К ТЕЗИСАМ БАЛАЦКОЙ Н.В. И ДР.)

Группы	Показатели	Срок наблюдения		
		3 суток	7 суток	30 суток
I (И/Р; n = 5)	MCP-1 (ng/mL) ТК	0,317±0,005*	1,73±0,16*	0,75±0,09*
	СК	0,404±0,06*	0,32±0,01	0,332±0,01
	GFAP (pg/mL) СК	334,12±190,4	810,9±269,3*	720,5±29,8*
II (И/Р + ресвератрол; n = 5)	MCP-1 (ng/mL) ТК	0,303±0,004**	0,31±0,02**	0,34±0,002**
	СК	0,33±0,013**	0,31±0,04	0,339±0,005
	GFAP (pg/mL) СК	27,56±5,4**	112,6±28,4**	96,33±37,4**
III (контрольная; n = 10)	MCP-1 (ТК ng/mL)		0,30±0,002	
	СК		0,31±0,005	
	GFAP (pg/mL) СК		267,9±27,2	

Примечание. n – количество тест-проб; * – достоверно относительно показателей контрольной группы; ** – достоверно относительно I-й группы (***) – p < 0,05).

ВЛИЯНИЕ СОСТАВА ПИТАТЕЛЬНОЙ СРЕДЫ НА СИНТЕЗ КАПСУЛЬНОГО ПОЛИСАХАРИДА *STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE* 3 СЕРОТИПА

Барановская С.А., Токарская М.М., Елкина С.И.

ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова» РАН, Москва, Россия

Для профилактики пневмококковой инфекции применяют конъюгированные пневмококковые вакцины, созданные на основе капсульного полисахарида (КПС). Поскольку серотиповой пейзаж *S. pneumoniae* на различных территориях отличается, то при разработке современных иммунобиологических препаратов необходимо учитывать данные эпидемиологических исследований. Известно, что 3 серотип пневмококка был актуален для территории нашей страны с начала изучения серотипового пейзажа, и до сих пор его наиболее часто (до 18% случаев) высевают при острых средних отитах, самой распространенной форме пневмококковой инфекции у детей до 5 лет (Харит С.М. и соавт., 2011). Качество препаратов, на основе которых будут в дальнейшем созданы иммунобиологические препараты, является ключевым моментом, поскольку от него зависит протективный эффект вакцин. Так как КПС получают из культуральной жидкости, то необходимо, чтобы питательная среда обеспечивала максимальную скорость роста и высокий уровень синтеза КПС, а также не содержала продукты животного происхождения и высокомолекулярные соединения, которые осложняют очистку КПС. Поэтому целью данного исследования являлась оценка накопления КПС штаммом *S. pneumoniae* 3 серотипа при выращивании в полусинтетических питательных средах, различного состава. Для достижения данной цели поставлены был подобран состав питательной среды, обеспечивающий высокий выход КПС, определена динамика роста штамма и накопление им КПС.

В работе использовали штамм *S. pneumoniae* серотипа 3 (№ 10196), предоставленный лабораторией микробиологии НЦЗД МЗ РФ. В ранее проведенных исследованиях показано, что данный штамм является продуцентом КПС. Посевную культуру выращивали в течение 16 часов при 37 °С на плотной питательной среде с 5% CO₂. В ка-

честве солевой основы использовали среду Ледерберга. В качестве источника аминокислот применяли: аминокислотный гидролизат казеина, а также соевый пептон. Глюкозу и минеральные соли стерилизовали при 1 атмосфере в течение 30 минут. Витамины стерилизовали фильтрованием. Культивирование штамма проводилось в бактериологических пробирках, содержащих по 30 мл питательной среды. В каждую пробирку засеивали 0,2 мл посевной культуры. Выращивание осуществляли в течение 24 и 96 часов при температуре 37 °С в термостате с 5% подачей CO₂. Посевные дозы составили 1,1 и 0,67 млрд/мл соответственно. Для определения динамики роста штамма и накопления им КПС проводили культивирование в ферментере объемом 10 л. Посевная доза составила 0,125 млрд/мл. Каждый час в течение 16 часов, а также спустя 24 часа проводили контроль оптической плотности и измерение pH. Накопление КПС оценивали при помощи ракетного иммуноэлектрофореза формализированных проб культуральной жидкости. В качестве референс-препарата использовали очищенный КПС.

Проведенные исследования показали, что наиболее высокий уровень КПС наблюдался при щелочном значении pH в тех питательных средах, в которых источниками являлись пептоны (среда с соевым пептоном – концентрация КПС от 20,1±2,5 до 28,0±4,3 мкг/мл; среда с казеиновым пептоном – от 16,8±2,1 до 26,4±5,3 мкг/мл) независимо от длительности культивирования. При выращивании в средах, содержащих другие источники белка, было выявлено незначительное накопление КПС (среда с кислотным гидролизатом казеина – от 2,4±0,8 до 7,8±1,5 мкг/мл; с аминокислотным пептоном – от 1,8±0,8 до 6,5±1,5 мкг/мл). Схожие данные были получены при выращивании в средах с пониженным значением pH. Вместе с тем выявлено, что выраженную продукцию КПС позволило получить использование в качестве источника аминокислот аминокислотного пептона (10,4±1,3 мкг/мл). Вероятно, наблюдавшееся спустя 96 часов снижение уровня КПС по сравнению с результатами через 24 часа произошло в результате действия ферментов *S. pneumoniae*, либо является следствием более низкой посевной дозы. При выращивании штамма в ферментере с использованием полусинтетической среды, содержащей соевый пептон, содержание КПС спустя 24 часа составило около 160 мкг/мл.

Таким образом, выращивание *S. pneumoniae* сер.3 в ферментере в течение 24 часов в полусинтетической питательной среде, содержащей соевый пептон, позволяет получить КПС в концентрации 22 мкг/мл.

ВКЛАД ИММУННОЙ СИСТЕМЫ В РЕГЕНЕРАТОРНОЕ ВЛИЯНИЕ ПРОДУЦИРУЕМЫХ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫМИ СТРОМАЛЬНЫМИ КЛЕТКАМИ МИКРОВЕЗИКУЛЯРНЫХ ЧАСТИЦ

Белгородцев С.Н., Кащенко Э.А., Селедцова Г.В.

Научно-исследовательский институт
фундаментальной и клинической иммунологии,
Новосибирск, Россия

Исследования последних лет показали, что цитопроактивное действие мезенхимальных стромальных клеток (МСК) обусловлено не процессами их хоминга и дифференцировки, а стимуляцией эндогенной регенерации резидентных клеток. Одним из механизмов подобного действия, кроме секреции цитокинов и факторов роста,

могут быть микровезикулярные частицы (МВ), которые осуществляют транспорт мРНК, микроРНК и сигнальных белков.

Цель. Изучить прорегенераторные свойства МВ, продуцируемых МСК и возможное участие в этом иммунной системы.

МСК получали из костного мозга лабораторных мышей путем прилипания к культуральному пластику. Для получения МВ, МСК подвергали апоптозу путем культивирования в условиях депривации кислорода и в бессывороточной среде в течение 1 суток. МВ получали из культуральной среды апоптотических клеток после предварительного удаления клеточного дебриса и последующем центрифугировании при 100 000 g в течение 60 минут. Для стандартизации суспензии МВ определяли содержание белка по методу Брэдфорда.

Для исследования влияния МВ на регенерацию тубулярного почечного эпителия *in vivo* у линейных мышей путем внутримышечного введения 50% глицерола была индуцирована острая почечная недостаточность (ОПН). МСК или МВ вводили в интравенно через 24 часа после индуцирования ОПН. Животные были разделены на 3 группы: ОПН-контроль, ОПН+МСК, ОПН+МВ.

Почечные эпителиоциты и спленоциты получали из гомогенатов соответствующих органов. Суспензию клеток почки пропускали через фильтр с диаметром пор 40 мкм, что позволяло избавиться от гломерул и клеточных агрегатов, и культивировали в течение 2-х недель, что позволяло получить гомогенную популяцию клеток.

После индукции ОПН, уровень мочевины плазмы крови повышался у мышей на 4-е сутки в контрольной группе в 2 раза (12,43 мкг/мл против 6,59 мкг/мл у интактных мышей) и снижался к 8-м суткам до 9,64 мкг/мл. Использование МСК и МВ приводило практически к одинаковому результату: на 4-е сутки уровень мочевины составил 9,3 и 9,37 мкг/мл соответственно, что на 25% ниже, чем в глицерол-контроле. К 8-м суткам уровень мочевины составил 7,9 мкг/мл после введения МСК и 7,6 мкг/мл после введения МВ, что на 21% ниже, чем в глицерол-контроле.

Уровень пролиферации спленоцитов в тесте с H³-тимидином составил 118 имп/мин, Кон А-стимулированная пролиферация составила 1208 имп/мин. Культивирование в присутствии МВ в дозе 10 мкг/мл повышало пролиферативную способность спленоцитов почти в 3 раза (342 имп/мин – спонтанная, 3889 имп/мин – Кон А-стимулированная). Стимулирующий эффект на пролиферацию повышался, хоть и не пропорционально с увеличением дозы МВ: 475 имп/мин – спонтанная и 4667 имп/мин – Кон А-стимулированная при добавлении МВ в дозе 30 мкг/мл; 492 имп/мин – спонтанная и 5012 имп/мин – Кон А-стимулированная при добавлении МВ в дозе 90 мкг/мл.

Аналогичный эффект наблюдался в отношении ПЭ. Добавление МВ в культуральную среду на 3 суток в дозе 10 мкг/мл повышало пролиферацию ПЭ в 4 раза (254 имп/мин против 65 имп/мин в контроле). Увеличение дозы МВ также повышало пролиферацию ПЭ: 337 имп/мин при дозе МВ 30 мкг/мл и 392 имп/мин при дозе МВ 90 мкг/мл.

Влияние МВ на апоптогенное действие доксирубина на спленоциты определяли в тесте с окраской пропидум иодидом. При этом использовали спленоциты как от интактных мышей, так и от мышей с глицерол-индуцированной ОПН. Интересно, что сама по себе индук-

ция ОПН вызывает уменьшение количества апоптотных спленоцитов почти в 2 раза (16,3% против 29,17% у интактных мышей). Добавление МВ вызывает снижение уровня апоптоза как у интактных мышей (21,73%), так и мышей с ОПН (13,28%). Соответственно, обратно пропорционально увеличивался процент клеток, находящихся в S/M фазе клеточного цикла.

Полученные в результате эксперимента *in vivo* результаты показали, что внутривенное введение как МСК, так и МВ, продуцируемых МСК, в одинаковой степени приводит к более раннему восстановлению выделительной функции почек после глицерол-индуцированной ОПН. Это говорит о том, что про-регенераторное действие МСК в значительной степени, если не полностью, обусловлено продуцируемыми ими микровезикулярными частицами. Указанное действие МВ подтверждается результатами *in vitro* — продуцируемые МСК микровезикулярные частицы усиливали пролиферацию ПЭ, причем при увеличении дозы МВ это влияние усиливалось. Аналогичное действие МВ оказывают на клетки иммунной системы: *in vitro* отмечается дозозависимое усиление пролиферации спленоцитов и увеличение их устойчивости к влиянию апоптогенных факторов. Таким образом, продуцируемые МСК микровезикулярные частицы оказывают иммуностимулирующее действие. Этот результат противоречит литературным данным, что при ОПН, независимо от генеза, наблюдается активация иммунной системы, приводящая к усилению повреждения и про-регенераторное действие МСК обусловлено их иммуносупрессорным действием. Указанные результаты требуют дальнейших исследований о влиянии МВ на функции иммунной системы *in vivo*.

ВЛИЯНИЕ НК-КЛЕТОК НА АНГИОГЕНЕЗ В ПРИСУТСТВИИ ФАКТОРА РОСТА ЭНДОТЕЛИЯ СОСУДОВ

Белякова К.Л.¹, Шевелева А.Р.¹, Сельков С.А.¹, Соколов Д.И.^{1,2}

¹ ФГБНУ «Научно-исследовательский институт акушерства, гинекологии и репродуктологии им. Д.О. Отта», Санкт-Петербург, Россия

² ГБОУ ВПО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург, Россия

Введение. Физиологическое функционирование органов и тканей организма невозможно без адекватного снабжения их кислородом, питательными веществами и удаления из них продуктов обмена, которое осуществляется при помощи разветвленной сети кровеносных сосудов. Формирование сосудов является важнейшим процессом, протекающим в организме человека, каждый этап которого зависит от характера взаимодействия эндотелиальных клеток (ЭК) с клетками микроокружения, а также от баланса между стимуляторами и ингибиторами ангиогенеза, основными источниками которых являются клетки иммунной системы. Естественные киллеры — важнейшая популяция клеток иммунной системы, обладающая цитотоксическими функциями и участвующая в защите организма от вирусов и трансформированных клеток. Помимо этого, естественные киллеры являются источниками различных цитокинов и факторов роста, которые могут оказывать влияние на ангиогенез. В связи с этим изучение взаимодействий эндотелиальных клеток

и естественных киллеров является актуальной задачей современной биологии и медицины.

Цель. Изучить влияния естественных киллеров на формирование капилляроподобных структур ЭК в присутствии фактора роста эндотелия сосудов.

Материалы и методы. В работе использовали ЭК линии EA.Hy926 и естественные киллеры линии NK-92mi. В лунки 24-луночного планшета с трехмерным матриксом Matrigel (BD, США) вносили ЭК, к части лунок добавляли клетки линии NK-92mi либо непосредственно в лунку к ЭК (контактное культивирование), либо в поликарбонатную вставку с диаметром пор 0,1 мкм (дистантное культивирование), инкубировали в течение 24 часов. Для активации клеток использовали VEGF в различных концентрациях. При помощи микроскопа AxioObserver.Z1 и компьютерной системы анализа изображений оценивали длину и количество образованных капилляроподобных структур.

Результаты. Установлено, что при контактном и дистантном культивировании ЭК с НК-клетками как в присутствии VEGF, так и в его отсутствие наблюдали увеличение длины и снижение количества капилляроподобных структур по сравнению с монокультивированием ЭК. Количество тяжей снижалось при контактном культивировании ЭК с НК-клетками в присутствии VEGF в концентрации 100 нг/мл по сравнению с контактными культивированием ЭК с НК-клетками без VEGF. При дистантном культивировании ЭК с НК-клетками отмечали снижение длины капилляроподобных структур как в присутствии, так и в отсутствие VEGF по сравнению с контактными культивированием ЭК с НК-клетками. При дистантном культивировании ЭК с НК-клетками в присутствии VEGF в концентрации 1 нг/мл наблюдали снижение длины и увеличение количества клеточных тяжей по сравнению с контактными культивированием ЭК с НК-клетками в присутствии VEGF в той же концентрации. При дистантном культивировании ЭК с НК-клетками в присутствии VEGF наблюдали дозозависимое увеличение длины клеточных тяжей по сравнению с дистантным культивированием ЭК с НК-клетками без VEGF.

Вывод. Естественные киллеры за счет секреторной активности и контактного взаимодействия с ЭК влияют на формирование капилляроподобных структур эндотелиальными клетками.

МОДУЛЯЦИЯ ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ КОМПЛЕМЕНТА АНТИМИКРОБНЫМИ ПЕПТИДАМИ ЖИВОТНЫХ

Берлов М.Н.^{1,2}, Умнякова Е.С.¹, Кокряков В.Н.^{1,2}

¹ ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины», Санкт-Петербург, Россия

² Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия

Введение. Неконтролируемая или избыточная активация системы комплемента вносит существенный вклад в патогенез многочисленных заболеваний. Отсутствие доступных терапевтических средств, направленных на регуляцию комплемента, представляет собой серьезную медицинскую проблему. В настоящее время в клиническую практику внедрены всего два ингибитора комплемента, относящихся к числу наиболее дорогих лекарств в мире. В качестве возможного источника новых более дешевых лекарственных средств, модулирующих актив-

ность комплемента, могут рассматриваться катионные антимикробные пептиды (АМП) животных, включая как пептиды млекопитающих, для которых регуляция комплемента может быть одной из физиологических функций, так и структурно сходные с ними пептиды беспозвоночных. Согласно литературным данным, некоторые АМП (дефенсины, тахиплезин) способны формировать межмолекулярный комплекс с белком C1q и влиять на уровень активации комплемента.

Цель и задачи. Изучение способности ряда АМП млекопитающих и беспозвоночных животных формировать комплекс с белком C1q и оказывать влияние на активацию комплемента.

Материалы и методы. Комплексы АМП с C1q выявляли с использованием специфических антител к C1q либо C1q, конъюгированного с пероксидазой, а также методом поверхностного плазмонного резонанса. Активацию комплемента оценивали по лизису сенсibilизированных антителами эритроцитов барана. Активность С3-конвертаз оценивали по уровню С3а, определяемому методом иммуноферментного анализа. Антимикробную активность дефенсинов оценивали методом подсчета колоний.

Результаты. Показано формирование комплексов с C1q для ряда исследованных пептидов: α -дефенсин HNP-1 и β -дефенсин HBD-2 человека, протегрин-1 свиньи, ареницин-1 пескожила *Arenicola marina*, тахиплезин-1 мечехвоста *Tachypleus tridentatus*. Интересно отметить, что все перечисленные пептиды характеризуются доминированием β -структуры в молекуле. Пептиды с иной структурной организацией (α -спиральный LL-37 и полипролиновый профенин) не проявляют способности к взаимодействию с C1q. Полученные данные позволяют предполагать наличие в молекуле C1q множественных сайтов связывания β -структурных АМП различной аффинности.

Характер влияния АМП на активацию комплемента проявляет зависимость от природы пептида. При оценке активации комплемента по лизису сенсibilизированных эритроцитов барана дефенсины HNP-1-3 и ареницин демонстрируют ингибирующую активность. В то же время тахиплезин, пептид, проявляющий высокую степень гомологии с ареницином по первичной структуре, действует противоположным образом, усиливая активацию комплемента. Наблюдаемые эффекты подтверждаются и на уровне генерации С3а в соответствующих пробах (в присутствии дефенсинов и ареницина его концентрация достоверно меньше, а в присутствии тахиплезина – достоверно больше, чем в контрольных пробах). Таким образом, изученные АМП действуют на активацию комплемента на ранних стадиях, не позднее уровня С3-конвертазы. Учитывая способность данных пептидов взаимодействовать с белком C1q, можно предположить, что они в первую очередь оказывают влияние на функционирование комплекса C1. Интересно отметить, что в комплексе C1q-АМП влияние на функциональные свойства может быть взаимным. Нами показано, что в присутствии C1q (но не контрольного белка овальбумина) минимальная ингибирующая концентрация дефенсинов в отношении бактерии *Listeria monocytogenes* возрастает.

Заключение. Полученные данные позволяют рассматривать β -структурные АМП животных в качестве перспективных молекул для создания на их основе терапевтических средств для направленного воздействия на систему комплемента на уровне компонента C1.

Работа поддержана грантами РФФИ № 15-04-06471а и №16-34-00136 мол_а.

ГЕТЕРОГЕННОСТЬ БЕЛКОВЫХ ФРАКЦИЙ ГЕМОГЛОБИНА КОСТНОГО МОЗГА И СИСТЕМЫ КРОВИ ПРИ ЭКСТРЕМАЛЬНЫХ ВОЗДЕЙСТВИЯХ НА ОРГАНИЗМ

Бриллиант С.А., Юшков Б.Г.

ГАОУ СО «Институт медицинских клеточных технологий», Екатеринбург, Россия
Институт иммунологии и физиологии УрО РАН, Екатеринбург, Россия

В последние десятилетия ученые активно занимаются исследованиями в области изучения влияния экстремальных факторов на изменение соотношения изоформ гемоглобина в периферической крови. Следует отметить, что, помимо изменений белковых изоформ системы крови, немаловажную роль играют в процессе адаптации и модификации белковых фракций гемоглобина в костном мозге. Для этого необходимо понимание физиологического значения гетерогенности гемоглобина крови (ПК) и костного мозга (КМ), а также роли отдельных изоформ в компенсаторно-приспособительных реакциях организма в условиях экстремальных воздействий.

В связи с этим **цель** данного исследования – изучение гетерогенности белковых фракций гемоглобина костного мозга крыс при острой массивной кровопотере и иммобилизационном стрессе.

Материалы и методы. Острую массивную кровопотерю (ОМК) осуществляли из расчета 2,5% от массы тела животного. В качестве стрессорного фактора применяли предложенную Н. Selye модель нервно-мышечного напряжения (иммобилизация животных на операционном столике на спине) в течение 6 часов однократно. Животные были поделены на 5 групп: 1 группа – интактные животные (n = 12). Животных 2-ой (n = 10) и 3-ей групп (n = 10) забивали спустя 6 ч и 2 сут. после ОМК. Животных 4-ой (n = 10) и 5-ой групп (n = 10) забивали спустя 6 ч и 2 сут. после иммобилизации.

Для определения соотношения между фракциями гемоглобина использовали метод электрофореза в полиакриламидном геле по Г. Мауреру. Статистическую обработку данных проводили в программе «Statistica 6.0».

Результаты. Анализ данных показал, что у интактной группы животных общее содержание гемоглобина в КМ – 8,01 г/л и ПК – 135,6 г/л.

После кровопотери в костном мозге спустя 6 ч наблюдается увеличение 2,4,5 и 6 изоформ гемоглобина за счет снижения 1 и 3. Данная динамика продолжается и на более поздний срок после воздействия (2 сут.) за счет увеличения 1,4, 5 и 6 белковых фракций костного мозга. В периферической крови лишь на 2 сут. отмечается увеличение 1, 5 и 6 изоформ.

В условиях иммобилизации происходит изменение соотношения отдельных белковых фракций гемоглобина в костном мозге и периферической крови крыс. В КМ наблюдается понижение 1, 2 белковых фракций наряду с повышением 3, 4 изоформ гемоглобина. 5 белковая фракция в костном мозге падает, так же как и в ПК. Однако 6 белковая фракция гемоглобина достоверно увеличивается на 6 ч после воздействия в сравнении с интактной группой как в КМ, так и ПК.

Рассматривая динамику изменения гемоглобинового профиля костного мозга и периферической крови после иммобилизации, было установлено, что доминирующими фракциями остаются 3 и 4 на фоне снижения 1 и 2 белковых изоформ.

Выводы. Изменения гемоглобинового профиля костного мозга и системы крови при действии на организм острой массивной кровопотери и иммобилизации обусловлены качественной перестройкой эритропоэза. Острая массивная кровопотеря и иммобилизационный стресс вызывают увеличение интенсивности эритропоэза на поздние сроки после воздействия, которое сопровождается возрастанием числа молодых эритроцитов и незрелых форм (ретикулоцитов).

РОЛЬ МАКРОФАГОВ В ЛОКАЛЬНОЙ РЕГЕНЕРАЦИИ ОСТРОВКОВОГО АППАРАТА ПОДЖЕЛУДОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ ПРИ АЛЛОКСАНОВОМ ДИАБЕТЕ

Булавинцева Т.С.^{1,2}, Данилова И.Г.^{1,2}

¹ Уральский федеральный университет им. Б.Н. Ельцина, Екатеринбург, Россия

² Институт иммунологии и физиологии УрО РАН, Екатеринбург, Россия

Введение. Инсулинозависимый сахарный диабет (СД1) является аутоиммунным заболеванием, которое сопровождается разрушением β -клеток островков Лангерганса и развитием абсолютного дефицита инсулина. Макрофагам, локализованным в поджелудочной железе, принадлежит центральная роль, как в поддержке воспалительной реакции, так и в регуляции регенерации. Основными факторами, обеспечивающими эти два процесса, являются цитокины, локально выделяющиеся клетками моноцитарно-макрофагального ряда в очаг повреждения (Gusdon A.M., Corbett J.A., Mathews C.E., 2006).

Цель. Оценить секреторную активность макрофагов в поджелудочной железе и ее влияние на пролиферацию β -клеток в течении СД 1.

Материалы и методы. Исследование проведено на половозрелых крысах – самцах Wistar. Аллоксановый диабет был вызван путем введения раствора аллоксана в дозе 30 мг/100г (Danilova I.G. et al., 2015). Через 30 дней после первой инъекции аллоксана животные получали лечение иммуномодулятором (дериваты аминофталгидрозида) в течение 30 дней по схеме (Jukic T., Abidov M., Ihan A., 2011). В крови животных определяли уровень глюкозы, гликозилированного гемоглобина (HbA1c) и инсулина. В микропрепаратах поджелудочной железы с помощью иммуногистохимического исследования проведена оценка количества β -клеток, Ki-67⁺ β -клеток, макрофагов (CD68) а также особенности их локализации. В гомогенате поджелудочной железы путем иммуноферментного анализа определялось содержание основных макрофагальных цитокинов – IL-1 α , IL-6, IL-10.

Результаты. В периферической крови группы животных с аллоксановым диабетом были отмечены гипергликемия, повышение уровня Hb A1c, уменьшение содержания инсулина. В поджелудочной железе выявлено снижение общего количества инсулин-синтезирующих клеток более чем в 10 раз, а пролиферативная активность β -клеток (Ki-67⁺ β -клеток) уменьшалась в 2 раза. Количество CD68⁺ клеток возрастало в 9 раз относительно интактных животных, что сопровождалось значительным увеличением количества провоспалительных цитокинов

(TNF α , IL-1 α , IL-6). Компенсаторно возрастал уровень IL-10 в железе.

Модуляция функциональной активности макрофагов на фоне аллоксанового диабета способствовала снижению уровня глюкозы, нормализации Hb A1c и увеличению концентрации инсулина в периферической крови. Содержание β -клеток в поджелудочной железе увеличилось в 3 раза по сравнению с контрольными животными с аллоксановым диабетом, а количество Ki-67⁺ β -клеток соответствовало уровню интактных крыс. Макрофаги локализовались преимущественно возле островков, а их число уменьшалось в 3 раза. Данный факт отразился и на содержании цитокинов в поджелудочной железе. Уровень IL-1 α снижался в 2 раза, а IL-6 в 1,7 раза по сравнению с контрольной группой животных, а содержание IL-10 соответствовало показателям интактных крыс.

Заключение. Таким образом, в результате проведенного исследования выявлена зависимость между содержанием макрофагов инфильтрирующих островки Лангерганса, уровнем провоспалительных цитокинов в поджелудочной железе и пролиферативной активностью β -клеток в островке. Модуляция макрофагов, с одной стороны, обеспечивала снижение альтерации за счет уменьшения содержания «медиаторов воспаления», а с другой – стимуляцию пролиферации и функциональной активности β -клеток островкового аппарата. Сочетание этих процессов способствует повышению уровня инсулина в крови и частичного уменьшения гипергликемии. Полученные результаты представляют несомненный интерес с позиций раскрытия механизмов регуляции регенераторных процессов при развитии СД1 и имеют непосредственное отношение к решению задач клинической практики.

Исследование поддержано грантом РФФИ № 16-15-00039.

КОРРЕКЦИЯ АДАПТИВНЫХ И ВРОЖДЕННЫХ ФОРМ ИММУННОГО ОТВЕТА ПРИ ОСТРОМ ДЕСТРУКТИВНОМ ПАНКРЕАТИТЕ НА ФОНЕ ХРОНИЧЕСКОЙ АЛКОГОЛЬНОЙ ИНТОКСИКАЦИИ

Бушмина О.Н., Локтионова А.В., Долгарева С.А., Литвинова Е.С., Локтионов А.Л.

Курский государственный медицинский университет, Курск, Россия

Введение. Актуальность дальнейшего изучения деструктивных форм острого алкогольного панкреатита не вызывает сомнения, поскольку характеризуется максимально высокой летальностью и наибольшим числом осложнений. Это связано с объективными трудностями диагностики и выбора обоснованной лечебной тактики. Недостаточно ясен вопрос о сроках и методах проведения иммунореабилитации при остром деструктивном панкреатите (ОДП), развивающимся на фоне хронической алкогольной интоксикации (ХАИ).

Цель и задачи. Оценка фармакологической эффективности различных сочетаний иммуномодуляторов, антиоксидантов и мембранопротекторов в коррекции врожденных и адаптивных форм иммунного ответа при экспериментальном остром деструктивном панкреатите на фоне хронической алкогольной интоксикации.

Материалы и методы. В исследовании использовано 189 крыс Вистар средней массой 150 г с соблюдением

всех принципов работы с лабораторными животными. ХАИ моделировали 30- или 60-кратным (ХАИ-30 и ХАИ-60), через 24 часа, внутрижелудочным введением 20% раствора этанола, соответственно, в дозах 3 и 2 мл/кг. Экспериментальный ОДП моделировали на 25 и 55 день, соответственно, от первого введения этанола путем перевязки протоков левой и правой долей поджелудочной железы и трехкратной через 60 мин стимуляцией прозеринном в дозе 0,2 мг/кг. Экспериментальных животных с ОДП и ХАИ-30 делили на 3 равные части: 1-я группа фармакотерапию не получала; во 2-й группе вводили гепон (5 мг/кг внутрь через 24 часа, № 14), гипоксен (750 мг/кг внутрь в 1% крахмальной суспензии, № 14) и фосфоглив (800 мг/кг, внутрь в 1% крахмальной суспензии, № 14); в 3-й группе вводили глутоксим (20 мг/кг внутримышечно через 24 часа, № 5), мексидол (50 мг/кг внутривенно через 24 часа, № 5) и гептрал (760 мг/кг внутривенно через 24 часа, № 5). При ОДП на фоне ХАИ-60 одна часть животных получала только этанол, вторая – сочетание глутоксима, мексидола и гептрала. Забой крыс осуществляли через 24 часа после последнего введения этанола и препаратов. В качестве контроля использовали 15 животных без внешних признаков заболеваний. Формирование гуморального иммунного ответа оценивали на пятые сутки после иммунизации путем определения в селезенке числа АОК адаптивных форм иммунного ответа оценивали по количеству антителообразующих клеток (АОК). Гиперчувствительность замедленного типа оценивали по разнице масс регионарного и контрлатерального лимфатических узлов (РМ) и по разнице количества в них кариоцитов (РК) после введения разрешающей дозы антигена. Фагоцитарная активность нейтрофилов периферической крови оценивалась по фагоцитарному показателю (ФП), фагоцитарному числу (ФЧ) и индексу активности фагоцитоза (ИАФ). Кислородзависимую активность оценивали по НСТ-тестам, спонтанному (НСТ-сп.) и стимулированному опсонизированным и неопсонизированным зимозаном (НСТ-ст. н/з, НСТ-ст. о/з), коэффициентам активации на опсонизированный и неопсонизированный зимозан, коэффициент опсонизации (Кан, Као, Ко).

Результаты. У крыс с моделируемым ОДП на фоне ХАИ-30, в большей степени при ХАИ-60, установлено по сравнению со здоровыми животными снижение количества иммунных АОК в селезенке, РМ, РК, выраженное снижение числа фагоцитирующих клеток и поглощенных ими частиц, повышение метаболической активности нейтрофилов в НСТ-сп., НСТ-ст. о/з и н/з тестах. Однако резервы кислородзависимой активности фагоцитов (Као, Кан и Ко) снижались. Введение комбинации препаратов гепон, гипоксен и фосфоглива крысам с ОДП в сочетании с 30-дневной ХАИ корригировало, но не до нормы формирование адаптивных форм иммунного ответа (АОК и РМ), ФП, ФЧ, ИАФ, НСТ-сп. и НСТ-ст. о/з и н/з, еще более значимо Кан и Ко. Использование сочетания глутоксима, мексидола и гептрала нормализовало число иммунных АОК в селезенке экспериментальных животных, ФЧ, НСТ-ст. о/з и н/з, Кан, Ко, корригировало, но не до контрольной группы РМ, РК, ФП, ИАФ, НСТ-сп., Као. Использование глутоксима, мексидола и гептрала в условиях ОДП и ХАИ-60 корригировало уровень АОК, РМ, РК, фагоцитарную активность нейтрофилов, НСТ-сп. и НСТ-ст. о/з и н/з, Кан, но не влияло на сниженные Као и Ко.

Заключение. Таким образом, более эффективным сочетанием в коррекции адаптивных и врожденных форм иммунного ответа при ОДП, моделируемом на фоне ХАИ, оказалось сочетание глутоксима, мексидола и гептрала.

АНАЛИЗ КЛОНАЛЬНОГО РАЗНООБРАЗИЯ ГЕНОВ ИММУНОГЛОБУЛИНА ПРИ СЕКВЕНИРОВАНИИ ЕДИНИЧНЫХ В-ЛИМФОЦИТОВ

Бязрова М.Г.^{1,2}, Лушова А.А.², Садыкова Г.К.³, Прилипов А.Г.³

¹ Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

² ФГБУ «Государственный научный центр «Институт иммунологии» Федерального медико-биологического агентства, Москва, Россия

³ ФГБУ «Федеральный научно-исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии им. почетного академика Н.Ф. Гамалеи» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

Известны несколько некомбинаторных стратегий получения антигенспецифических моноклональных антител. К ним относятся гибридомная технология, иммортализация В-лимфоцитов вирусом EBV, а также создание моноклональных антител путем секвенирования генов иммуноглобулина методом NGS из пула клеток или стандартного секвенирования из единичных В-лимфоцитов. Последний метод имеет ряд преимуществ при выявлении редких клонотипов и в настоящее время активно разрабатывается. Метод состоит из следующих этапов: выявление и выделение антигенспецифических В-лимфоцитов, выделение мРНК из единичных клеток, секвенирование генов иммуноглобулина с последующей экспрессией в клетках-продуцентах. Каждый из отмеченных этапов представляет определенные трудности и требует оптимизации. Сложность метода связана с незначительным количеством мРНК, содержащейся в единичном В-лимфоците.

Цель. Создание человеческих терапевтических моноклональных антител против вируса клещевого энцефалита.

Задача работы состояла в отработке отдельных этапов технологии секвенирования генов иммуноглобулинов из единичных В-лимфоцитов: получение конъюгатов антител, необходимых для многоцветного окрашивания клеток; сортировка субпопуляции активированных В-лимфоцитов; амплификация и секвенирование генов Ig из единичных клеток.

Объекты исследования: лимфоциты периферической крови и костного мозга человека.

Методы. Обогащение лимфоцитов методом магнитной сепарации, проточная цитометрия, гнездовая ПЦР и секвенирование методом Сэнгера.

Результаты. Для окрашивания клеток использовали следующие комбинации антител: IgG-FITC/CD19-PE, CD19-FITC/CD27-PE, CD38-FITC/CD27-PE, а также CD19-FITC/CD38-PE/CD27-PE-Cy5.5. В препаратах лимфоцитов периферической крови и костного мозга человека были определены субпопуляции В-лимфоцитов: CD19⁺IgG⁺, CD19⁺CD27⁺, CD19⁺CD38⁺, CD19⁺CD27⁺CD38⁺.

Популяции CD19⁺IgG⁺, CD19⁺CD27⁺, CD27⁺CD38⁺ и CD27⁺CD38⁺CD3⁺CD16⁺ были отсортированы и разнесены по одной клетке в пробирки для ПЦР. Далее была проведена реакция обратной транскрипции с последующей амплификацией генов иммуноглобулина с помощью гнездовой ПЦР. Полученные ПЦР-фрагменты секвени-

ровали методом Сэнгера, при этом были получены отдельные сиквенсы генов иммуноглобулинов.

Выводы. Были отработаны некоторые этапы технологии получения человеческих моноклональных антител путем секвенирования генов иммуноглобулина из единичных клеток.

ГАЛЕКТИН-3 МОДУЛИРУЕТ ПРОДУКЦИЮ ЦИТОКИНОВ Th-ЛИМФОЦИТАМИ *IN VITRO*

Васильева О.А., Прохоренко Т.С., Зима А.П., Новицкий В.В.

ФГБОУ ВО «Сибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, Томск, Россия

Введение. Галектин-3 функционирует как экстрацеллюлярная регуляторная молекула и принимает участие в активации различных типов клеток, таких как моноциты, макрофаги, тучные клетки, нейтрофилы и лимфоциты.

Цель. Оценить влияние рекомбинантного галектина-3 на продукцию профильных цитокинов Th-лимфоцитами здоровых доноров *in vitro*.

Материалы и методы. Исследование проведено на лимфоцитах, выделенных методом градиентного центрифугирования из крови здоровых доноров ($n = 25$), с дальнейшим культивированием в течение 72 ч в питательной среде с добавлением рекомбинантного галектина-3 в дозах 0,5 и 1 мкг/мл (R&D, США). Для создания *in vitro* условий, близких к естественным, использовали моноклональные активирующие антитела – анти-CD3/анти-CD28 (BD Pharmingen™, США). За 4 ч до окончания инкубации к клеткам добавляли стимуляторы синтеза цитокинов ФМА (50 нг/мл) и кальция иономицин (1 мкг/мл). Определение уровня продукции интерлейкинов (IL) 17A, IL-10, интерферона (IFN) γ и IL-13, IL-22, TGF- β_1 , TNF α в культуральных супернатантах осуществляли методом твердофазного иммуноферментного анализа типа «сэндвич» согласно протоколам фирмы-производителя (R&D, США).

Результаты. Установлено, что при действии галектина-3 на лимфоциты здоровых доноров концентрация Th1-цитокинов – IFN γ и TNF α – достоверно увеличивалась относительно соответствующих значений в контрольной группе. Стимулирующее влияние отмечалось при исследовании влияния галектина-3 на продукцию IL-13, свойственного Th2-лимфоцитам. При анализе влияния галектина-3 на Th-17 лимфоциты регистрировалось статистически значимое повышение концентрации профильных цитокинов – IL-17A и IL-22 (при дозе галектина-3 0,5 мкг/мл). Увеличение дозы данного лектина до 1 мкг/мл приводило к снижению концентрации IL-17 и IL-22 относительно значений соответствующих показателей в культуре с меньшей концентрацией галектина-3 и было достоверно ниже значений в контрольной группе (только для IL-17). Влияние галектина-3 на функциональную активность субпопуляции T-регуляторных лимфоцитов проводили путем анализа продукции IL-10 и TGF- β_1 . В результате экспериментов наблюдалось достоверное уменьшение концентрации IL10 и TGF- β_1 относительно значений данных показателей в группе контроля.

Заключение. Проведенные эксперименты свидетельствуют о том, что влияние рекомбинантного галектина-3 является дозозависимым, и с увеличением его концентрации до 1 мкг/мл степень стимулирующего влияния на Th-лимфоциты становится менее выраженной, и преоб-

ладает ингибирующее действие на лимфоциты, что может быть обусловлено активацией апоптотической гибели клеток.

Исследование выполнено при финансовой поддержке Совета по грантам Президента Российской Федерации (№ НШ-7906.2016.7, МД-3455.2017.7).

Breg ПРИ ГУМОРАЛЬНОМ ИММУННОМ ОТВЕТЕ

Гаврилова М.В., Чернышова И.Н., Снегирева Н.А.

ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова», Москва, Россия

Введение. В последние годы выяснилось, что В-клетки, также как и Т-лимфоциты, обладают регуляторными функциями. В основном их роль сводится к угнетению воспалительных и аутоиммунных процессов. Влияние регуляторных В-клеток (Breg) на патологические процессы, главным образом, обусловлено синтезируемым ими IL-10. Основным источником Breg являются, по-видимому, В1-лимфоциты. Роль Breg в развитии гуморального иммунного ответа практически не изучена. Исследования такого рода удобно проводить в системе *in vitro*. Ранее нами была разработана модельная система, позволяющая использовать минимальное количество В1-лимфоцитов при изучении их взаимодействий с другими клетками *in vitro*. В этой системе в качестве клеток-«филлеров» используются спленоциты Х1D-мышей СВА/N, не имеющих В1-клеток. С другой стороны, адоптивный перенос Breg мышей линии СВА мышам конгенной линии СВА/N позволяет исследовать влияние этих клеток на гуморальный иммунный ответ *in vivo*.

Цель. Изучение роли Breg в гуморальном иммунном ответе. В задачи исследования входило: определение влияния Breg на иммунный ответ субпопуляций В-лимфоцитов на Т-зависимый антиген (ТЗ АГ) в модельной системе *in vitro* и на модели адоптивного переноса *in vivo*.

Материалы и методы. В1-лимфоциты выделяли из перитонеальной полости, В2 – из селезенки мышей линии СВА методом иммуномагнитной сепарации. При культивировании *in vitro* В1- и В2-клетки смешивали со спленоцитами линии мышей СВА/N в соотношении 1:9 соответственно. Breg выделяли из перитонеальной полости мышей линии СВА с использованием Regulatory B cell isolation kit. Методом проточной цитометрии было определено, что > 90% Breg синтезировало IL-10. Контрольные В-лимфоциты (Вконтр), получали так же, как и Breg, за исключением добавления активаторов. Вконтр содержали не более 4% синтезирующих IL-10 В-клеток. В качестве ТЗ АГ использовали водорастворимый антиген бараньих эритроцитов (ВРАБЭ), который добавляли в конечной концентрации 25 мкг/мл. Для раздельного культивирования Breg использовали мембранные вставки с полупроницаемой мембраной. Breg или Вконтр вносили в верхнюю камеру в количестве 1×10^6 , в нижнюю помещали 5×10^6 клеток смешанных культур. Клетки инкубировали в полной среде в CO₂-инкубаторе при 37 °C в течение 4 дней с АГ или без него. Функциональную активность В-лимфоцитов оценивали по числу АТ- и ИГ-образующих клеток (АОК и ИГОК соответственно) в культурах методом ELISPOT.

В опытах *in vivo* Breg вводили конгенным Х1D-мышам линии СВА/N по 1,5 млн внутривенно (в/в). Одновременно мышей иммунизировали в/в ВРАБЭ в дозе 50 мкг/мышь. В качестве контроля использовали нормальных мышей линии СВА/N и мышей СВА/N, получивших Вконтр и ВРАБЭ, и только Вконтр. На 4-й день

после адоптивного переноса клеток и иммунизации у мышей-реципиентов получали селезенки и определяли в них число АОК и ИГОК.

Результаты. Добавление ВРАБЭ индуцировало иммунный ответ в смешанных культурах: прирост числа АОК для культуры с В2-клетками составил $478 \pm 190/10^6$ клеток, а числа ИГОК — $3745 \pm 2565/10^6$ клеток. Для культуры с В1-лимфоцитами соответствующие показатели составили для АОК $345 \pm 186/10^6$, а для ИГОК — $13133 \pm 6023/10^6$ клеток. Внесение в верхнюю камеру Вконтр в культуре с В2-лимфоцитами приводило к увеличению прироста АОК и ИГОК ~ в 2 раза. Добавление Врег значительного влияние на прирост АОК и ИГОК не оказывало. На культуру, содержащую В1-клетки, Вконтр и Врег действовали по-другому. Внесение в верхнюю камеру Вконтр почти не влияло на образование АОК и ИГОК, индуцированных ВРАБЭ. В то же время добавление в верхнюю камеру Врег уменьшалось в смешанной культуре с В1-лимфоцитами прирост АОК с $344 \pm 185/10^6$ до значения $201 \pm 94/10^6$ и ИГОК — с $13133 \pm 6023/10^6$ до $7045 \pm 1924/10^6$ клеток.

Таким образом, Врег угнетали индуцированный ВРАБЭ специфический и поликлональный иммунный ответ в культурах с В1-лимфоцитами. Очевидно, что это угнетение в значительной степени обусловлено выделяемым Врег-клетками IL-10.

Для исследования влияния Врег на иммунный ответ на ВРАБЭ *in vivo* была использована модель адоптивного переноса. Оказалось, что Врег, перенесенные одновременно с введением ТЗ АГ конгенной линии мышей СВА/Н, способствовали снижению прироста числа АОК на 31%. Это свидетельствует о том, что *in vivo* Врег могут угнетать первичный специфический ответ на ТЗ АГ. Вконтр не оказывали такого влияния на иммунный ответ. Таким образом, данные *in vivo* о влиянии Врег на иммунный ответ согласуются с результатами исследований, полученными в модельной системе *in vitro*.

Заключение. Установлено, что Врег оказывают угнетающее действие на образование АТ-продукентов на ТЗ АГ (ВРАБЭ) в модельной системе *in vitro* и при адоптивном переносе *in vivo*.

ВЛИЯНИЕ МП-5 И МП-6 НА МИКРОБИЦИДНУЮ АКТИВНОСТЬ И ПРОДУКЦИЮ IL-1 β И IL-10 ПЕРИТОНЕАЛЬНЫМИ МАКРОФАГАМИ ПРИ СТРЕССЕ

Гаврилова Т.В.⁴, Гейн С.В.^{1,3}, Никитина А.А.³, Гейн О.Н.⁶, Черешнева М.В.², Черешнев В.А.², Кирилина Е.А.⁴

¹ ФГБУН «Институт экологии и генетики микроорганизмов» УрО РАН, Пермь, Россия

² ФГБУН «Институт иммунологии и физиологии» УрО РАН, Екатеринбург, Россия

³ ФГБОУ ВПО «Пермский государственный научно-исследовательский университет», Пермь, Россия

⁴ ФГБОУ ВПО «Пермский государственный медицинский университет им. академика Е.А. Вагнера», Пермь, Россия

⁵ ФГБУН «Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова» РАН, Пермь, Россия

⁶ ФГБОУ ВПО «Пермская государственная фармацевтическая академия», Пермь, Россия

Введение. Миелопептиды — группа короткоцепочных биорегуляторных молекул пептидной природы, обладающая широким спектром иммунорегуляторной активности за счет возможного направленного влияния отдель-

ных пептидных фракций на различные звенья иммунной системы.

Цель. Исследовать влияние миелопептидов МП-5 и МП-6 на продукцию активных форм кислорода, IL-1 β и IL-10 перитонеальными макрофагами мышей на фоне иммобилизационного стресса *in vivo*.

Материалы и методы. Эксперименты в системе *in vivo* выполнены на мышках-самцах породы Swiss, массой 17-22 г. В качестве стрессорного воздействия использовался 2-часовой иммобилизационный стресс. МП-5 или МП-6 вводили внутривентриально за 30 минут до начала стресса в дозе 40 мкг/кг. Оценку продукции активных форм кислорода перитонеальными клетками производили с помощью реакции люминолазависимой хемилюминесценции. Для оценки продукции цитокинов перитонеальные макрофаги культивировали в 24-луночных планшетах 10^6 клеток в 1 мл полной культуральной среды. Количественное определение IL-1 β и IL-10 проводили с помощью наборов (R&D, США).

Результаты. Установлено, что иммобилизационный стресс не влиял на спонтанную продукцию активных форм кислорода. Миелопептид МП-5 стимулировал спонтанную продукцию активных форм кислорода макрофагами, в то время как статистически значимых эффектов МП-6 на спонтанную ЛЗХЛ зарегистрировано не было. При анализе стимулированной ЛЗХЛ было установлено, что стресс угнетал продукцию активных форм кислорода в зимозан-стимулированных культурах, а МП-5 отменял эффект стресса. В группах животных, подвергнутых стрессу на фоне введения МП-6, наблюдалось усиление продукции активных форм кислорода по сравнению с контрольной группой и с группой животных, подвергнутых стрессу. В дальнейшем мы оценивали влияние МП-5 и МП-6 при стрессе на продукцию IL-1 β и IL-10. Стресс угнетал зимозан-индуцированную продукцию IL-1 β , предварительное введение мышам МП-5 и МП-6 стресс-индуцированное угнетение IL-1 β отменяло. На продукцию IL-10 стресс влияния не оказывал, в то же время наблюдалось выраженное снижение спонтанной и стимулированной продукции IL-10 в группе животных, подвергнутых стрессу на фоне введения МП-5.

Заключение. Таким образом, миелопептиды МП-5 и МП-6 оказывают модулирующее действие на функции стимулированных зимозаном перитонеальных макрофагов, отменяя стресс-индуцированное угнетение продукции активных форм кислорода и IL-1 β . В общем полученные нами данные указывают на перспективность дальнейшего исследования иммуномодулирующих эффектов МП-5,6 и других отдельных миелопептидов.

Работа поддержана грантом РФФИ 16-44-590156-р-а.

ВЛИЯНИЕ ХОЛОДОВОГО СТРЕССА НА ФУНКЦИОНАЛЬНУЮ АКТИВНОСТЬ ПЕРИТОНЕАЛЬНЫХ МАКРОФАГОВ В УСЛОВИЯХ БЛОКАДЫ ОПИАТНЫХ РЕЦЕПТОРОВ

Гейн С.В.^{1,2}, Шаравьева И.Л.¹

¹ Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН, Пермь, Россия

² Пермский государственный научно-исследовательский университет, Пермь, Россия

Введение. Холодовой стресс — стрессорное воздействие, вызванное низкой температурой окружающей

среды. Хорошо известно, что переохлаждение вызывает характерный для любого стресса гормональный сдвиг, ухудшает двигательные и когнитивные функции, модулирует продукцию IL-1 β , TNF α , IL-6, IL-10. Роль опиоидных пептидов в регуляции функций клеток иммунной системы при стрессе заслуживает особого внимания, поскольку секретируемые при стрессе в периферическую кровь опиоидные пептиды, оказывают стресс-протективный, обезболивающий и иммунорегуляторный эффекты.

Цель и задачи. Исследовать влияние блокады опиатных рецепторов на уровень кортикостерона в плазме крови, продукцию активных форм кислорода, IL-1 β , TNF α , IL-10 перитонеальными макрофагами при остром холодном стрессе у мышей *in vivo*.

Материалы и методы. Эксперимент выполнен на белых мышцах самцах массой тела 20–22 г. Мыши подвергались острому переохлаждению при -20 °C в течение 10 или 60 минут. Антагонист опиатных рецепторов налоксона гидрохлорид вводили в дозе 0,2 мг/кг подкожно за 20 мин до стресса. Через 1 час после окончания стрессорного воздействия мышей выводили из эксперимента методом декапитации под эфирным наркозом. Оценку продукции активных форм кислорода перитонеальными макрофагами осуществляли с использованием реакции люминолзависимой хемилюминесценции. Для определения продукции цитокинов перитонеальные макрофаги культивировали в среде RPMI 1640 с добавлением 10% инактивированной фетальной сыворотки, 100 ЕД/мл гентамицина, в 24-луночных планшетах, содержащих $2,5 \times 10^6$ клеток на лунку. Через 24 часа супернатанты собирали в пробирки «Эппендорф», замораживали и хранили при -20 °C. Определение концентрации цитокинов в супернатантах клеточных культур проводили с использованием иммуноферментных тест-систем R&D (США). Концентрацию кортикостерона в плазме крови определяли иммуноферментным методом с использованием тест-систем Enzo (США). Статистическая обработка результатов проведена с использованием двухфакторного дисперсионного анализа и LSD-критерия для межгруппового сравнения. Все данные на рисунках представлены в виде средней и ее стандартной ошибки.

Результаты. Установлено, что экспозиция мышей при -20 °C в течение 10 мин приводила к угнетению продукции АФК макрофагами, эффект нивелировался на фоне введения налоксона. В группе животных, подвергнутых 60 мин стрессу, напротив, наблюдалась налоксон-зависимая стимуляция продукции АФК. Оба варианта холодного стресса не оказывали значимого влияния на продукцию IL-1 β . Продукция TNF α на фоне 60 мин охлаждения налоксон-зависимо стимулировалась как в спонтанных, так и в зимозан-стимулированных культурах. Продукция макрофагами IL-10 усиливалась независимо от продолжительности холодного воздействия, в условиях стимуляции и без нее, и отменялась на фоне блокады опиатных рецепторов.

Заключение. Таким образом, направленность действия острого холодного стресса на функции макрофагов зависела как от исследуемого параметра, так и времени воздействия, при этом блокада опиатных рецепторов существенно модифицировала иммунорегуляторные эффекты переохлаждения.

Работа поддержана грантом РФФИ № 14-04-96002-р-а.

ВЛИЯНИЕ СИСТЕМНОЙ БЛОКИРОВКИ TNF НА РОСТ И МЕТАСТАЗИРОВАНИЕ МСА 205 ФИБРОСАРКОМЫ *IN VIVO*

Гоголева В.С.^{1,2}, Атретханы К.-С. Н.^{1,2},
Носенко М.А.^{1,2}, Недоспасов С.А.^{1,2,3}, Друзцкая М.С.^{1,2}

¹ ФГБУН «Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта» РАН, Москва, Россия

² Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

³ Научно-исследовательский институт физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

Фактор некроза опухолей (TNF) – цитокин с широким спектром действия, выполняющий важную роль в иммунной регуляции и воспалении. На данный момент блокаторы TNF широко применяются в терапии аутоиммунных заболеваний (Drutskaya M.S. et al., 2010). Роль TNF в развитии опухолей неоднозначна (Balkwill F., 2009). Одной из функций TNF в опухолевом микроокружении является поддержание метастазирования. При этом 90% случаев смерти онкологических больных связано именно с возникновением метастазов, а не первичной опухолью (Lambert A.W. et al., 2017). Изучение роли TNF в метастазировании актуально не только с точки зрения понимания молекулярных механизмов метастатического каскада, но может также иметь клиническое значение.

Цель. Исследование роста и метастазирования перевиваемой опухолевой линии МСА 205 фибросаркомы у мышей на фоне системной анти-TNF терапии.

Работу проводили на гуманизированных по TNF мышцах, которым каждые три дня вводили блокаторы TNF инфликсимаб или этанерцепт, а контрольной группе – PBS. Опухолевые клетки МСА 205 фибросаркомы вводили через неделю после начала применения блокаторов TNF. Объем опухоли измеряли каждые 3–5 дней. В конце эксперимента проводили анализ различных популяций спленцитов методом проточной цитофлуориметрии, оценивали уровень экспрессии генов в опухоли методом ПЦР в реальном времени, осуществляли иммуногистохимический анализ опухолевых образцов, а также изучали развитие миелоидных клеток *in vitro* на фоне нейтрализации TNF.

В ходе данной работы было обнаружено, что фармакологическая блокировка TNF приводит к замедлению роста опухолей у самок, что коррелирует с уменьшением накопления миелоидных супрессорных клеток, обладающих проопухолевой активностью (Atratkhanu K.S. et al., 2016). Кроме того, мы обнаружили, что нейтрализация TNF влияет на развитие миелоидных клеток: при дифференцировке *in vitro* в присутствии блокаторов TNF моноцитарная популяция незрелых миелоидных клеток в большей степени подвержена клеточной смерти. Системная нейтрализация TNF у самцов не влияла на первичный рост опухоли, но на более позднем этапе предотвращала возникновение метастазов. При нейтрализации TNF происходило понижение экспрессии ангиогенных и супрессорных белков, таких как *Hif1a*, *Vegfa*, *Fgf2* и *Icam1*, в опухолевых образцах. Иммуногистохимический анализ показал, что нейтрализация TNF может приводить к подавлению ангиогенеза.

Таким образом, мы обнаружили, что TNF необходим для роста перевиваемой опухолевой линии МСА 205 фи-

бросаркомы *in vivo*. Кроме того, TNF способствует выживанию миелиоидных клеток, а также играет важную роль в ангиогенезе и метастазировании.

Работа была осуществлена при поддержке гранта Президента РФ для ведущих научных школ НШ-10014.2016.4

ДЕФИЦИТ АРГИНИНА, ВЫЗВАННЫЙ АКТИВНОСТЬЮ СРЕПТОКОККОВОЙ АРГИНИНДЕИМИНАЗЫ, СНИЖАЕТ ПРОДУКЦИЮ МАКРОФАГАМИ ОКСИДА АЗОТА

Головин А.С.¹, Бузова Л.А.¹, Соколов А.В.^{1,2},
Старикова Э.А.¹, Фрейдлин И.С.^{1,2,3}

¹ ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины»,
Санкт-Петербург, Россия

² Санкт-Петербургский государственный университет,
Санкт-Петербург, Россия

³ Первый Санкт-Петербургский государственный
медицинский университет им. акад. И.П. Павлова,
Санкт-Петербург, Россия

Введение. Ключевым компонентом врожденного иммунитета, контролирующим агрессию патогенных стрептококков (*Streptococcus pyogenes*) в организме, являются макрофаги. Одним из механизмов антибактериальной активности этих клеток служит продукция оксида азота (NO). Продукция оксида азота макрофагами опосредована ферментом NO-синтазой II, субстратом которого является аргинин. NO является важной внутри и межклеточной сигнальной молекулой, регулирующей пролиферацию и дифференцировку клеток адаптивного иммунитета, а также, обладает бактерицидной активностью. Аргинин используется в качестве субстрата бактериальным ферментом аргининдеиминазой (АД), который продуцирует *S. pyogenes*. Дефицит аргинина, вызванный действием аргининдеиминазы *S. pyogenes*, может приводить к дисрегуляции воспаления и нарушению формирования адекватного иммунного ответа.

Цель. Оценить влияние стрептококковой АД на продукцию NO макрофагами линии J774.

Материалы и методы. Эксперименты проводили на модельной системе мышинных макрофагов перевиваемой линии J774. В работе использовали супернатанты разрушенных ультразвуком *S. pyogenes* M49-16 и его изогенного мутанта с делецией гена АД M49-16delAD (любезно предоставлены проф. Суворовым А.Н., отдел молекулярной микробиологии, ФГБНУ «ИЭМ», Санкт-Петербург), содержащие биологически активные внутриклеточные компоненты бактерий. Клетки линии J774 вносили в планшет и добавляли в лунки супернатанты разрушенных стрептококков исходного или мутантного штамма. Для индукции синтеза NO в лунки планшета вносили ЛПС. В некоторые лунки вносили аргинин дополнительно. После 24 часов инкубации измеряли концентрацию оксида азота в надосадке с помощью реактива Грисса. Количество аргинина в экспериментальных пробах определяли с помощью модифицированной реакции Сукагуши.

Результаты. Предварительно проводили подбор концентрации супернатанта M49-16, в которой он обладал максимальной способностью гидролизовать аргинин. Для этого оценивали количество аргинина в экспериментальных пробах после инкубации с различными разведениями супернатанта исходного штамма. Для дальнейшей работы было выбрано оптимальное разведение супернатантов разрушенных стрептококков 1 мкл/100 мкл культуральной среды. В этом разведении наблюдалось

достоверное снижение количества аргинина в экспериментальных пробах, содержащих супернатант исходного штамма ($p < 0,001$). Количество аргинина в пробах с супернатантом штамма M49-16delAD достоверно не снижалось. Исследование показало, что супернатант *S. pyogenes* M49-16 достоверно подавлял индуцированную ЛПС продукцию NO клетками линии J774 ($p < 0,0001$). При этом продукция NO в присутствии супернатанта *S. pyogenes* M49-16delAD не изменялась. Добавление аргинина приводило к трехкратному увеличению продукции NO клетками линии J774, инкубированными в присутствии супернатанта исходного штамма ($p < 0,0001$). Продукция NO клетками, инкубированными в присутствии супернатанта M49-16delAD, при добавлении аргинина достоверно не отличалась от контрольного уровня.

Заключение. Полученные данные свидетельствуют о способности стрептококковой АД приводить к снижению продукции NO клетками линии J774 за счет деплеции аргинина в культуральной среде.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ № 16-04-00150.

ОСОБЕННОСТИ РЕАКЦИИ МАКРОФАГОВ ПЕЧЕНИ НА ДЕЙСТВИЕ ВОДОРАСТВОРИМОГО СОЕДИНЕНИЯ КРЕМНИЯ В ЭКСПЕРИМЕНТЕ

Гордова В.С., Григорьева Е.А., Сергеева В.Е.,
Смородченко А.Т.

ФГБОУ ВО «Чувашский государственный университет
им. И.Н. Ульянова, Чебоксары, Россия

Институт вегетативной анатомии, клиника Шарите,
университет Гумбольдта, Берлин, Германия

Макрофаги печени – особая популяция резидентных макрофагов, которым в последнее время, в связи с изучением иммунных функций печени, уделяется большое внимание. Нами уже было изучено влияние длительного поступления в организм с питьевой водой соединения кремния на макрофаги тимуса, селезенки, лимфоидных узлов тонкого кишечника и прилежащих к ним кишечных ворсинок и показано, что макрофаги уменьшаются в размерах, в них меняется содержание нейромедиаторных биогенных аминов, на их цитоплазме увеличивается экспрессия МНС II. Однако вопрос, является ли действие кремния, поступающего с питьевой водой идентичным для всех популяций макрофагов, остается открытым.

Цель. Изучение макрофагов печени лабораторных крыс на длительном сроке поступления в организм водорастворимого соединения кремния.

Материалы и методы. Изучали печень 10 нелинейных крыс-самцов. Контрольная группа (5 крыс), получала *ad libitum* стандартизованную питьевую воду, подопытная (5 крыс), получала *ad libitum* ту же воду с добавлением девятиводного метасиликата натрия в концентрации 10 мг/л в пересчете на кремний. Через девять месяцев животные были выведены из эксперимента, макрофаги в парафиновых срезах печени выявляли непрямым иммуногистохимическим методом. Первичные антитела – мышинные антитела против CD68 (clon ED1, Abcam, Cambridge, UK), вторичные антитела – меченные биотилином козы антитела (Vector Laboratories, U.S.). Для визуализации позитивного окрашивания срезы инкубировались с авидин-биотиновым комплексом и диамино-бензидином (Vector Laboratories, U.S.). Изучали макрофаги в десяти полях зрения ($\times 400$, $\times 900$), о степени экспрессии CD68 судили

по интенсивности светопропускания мембраны и цитоплазмы макрофагов, которую проводили с помощью демо-версии программы Sigma Scan Pro5.

Результаты. Макрофаги, экспрессирующие маркер CD68, имеют темно-коричневую окраску мембраны и светло-коричневую цитоплазму, располагаются преимущественно вдоль синусоидных капилляров. Их количество сопоставимо для обеих групп крыс и составляет 18-20 клеток в поле зрения ($\times 400$), однако у крыс, получавших кремний с водой, визуальными макрофаги имеют меньшее количество отростков и более темную цитоплазматическую мембрану. Средняя площадь макрофагов составила $179,23 \pm 5,94$ мкм² и $117,04 \pm 3,35$ мкм² для контрольной и подопытной групп соответственно ($p < 0,001$). Интенсивность светопропускания цитоплазматической мембраны составляет $110,20 \pm 11,06$ у.е. и $102,47 \pm 1,66$ у.е., цитоплазмы – $88,15 \pm 8,15$ у.е. и $83,96 \pm 1,82$ у.е. для контрольной и подопытной групп соответственно, что свидетельствует о том, что на поверхности звездчатых макрофагов крыс, получавших кремний, находится большее количество маркера CD68. Таким образом, морфологическая реакция макрофагов как печени, так и лимфоидных органов при данном виде воздействия в течение длительного времени имеет сходный характер.

Заключение. Наши наблюдения свидетельствуют, что при поступлении с питьевой водой соединения кремния макрофаги печени, уменьшаясь в размерах, компенсируют это увеличением экспрессии CD68 на своей цитоплазматической мембране, что можно расценивать как адаптационную реакцию в ответ на снижение фагоцитарной функции.

ЭФФЕКТЫ ГЕНЕТИЧЕСКОГО БЭКГРАУНДА НА ФЕНОТИПИЧЕСКИЕ ПРОЯВЛЕНИЯ МУТАЦИИ K72W ЦИТОХРОМА C *IN VIVO*

Горшкова Е.А.¹, Недоспасов С.А.^{1,2}, Шилов Е.С.¹

¹ Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

² ФГБУН «Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта» РАН, Москва, Россия

Цитохром С является незаменимым элементом дыхательной цепи митохондрий, а также выступает в роли одного из медиаторов внутреннего пути апоптоза. У мышей полный генетический нокаут соматического цитохрома С приводит к эмбриональной летальности. Ранее было показано, что точечная мутация замены лизина-72 нарушает только проапоптотические функции белка и на смешанном генетическом фоне приводит к различным эффектам для разных систем организма *in vivo*.

Мы перевели ранее полученных мышей с заменой остатка лизина-72 на триптофан (K72W-мыши) в последовательности соматического цитохрома С на смешанный генетический бэкграунд линий C57BL/6 и 129S2, поскольку на чистом генетическом фоне C57BL/6 они демонстрировали нормальный фенотип. Мы предположили, что проявление аномального фенотипа гомозиготных по K72W мышей зависит от генов-модификаторов, специфических для линии 129S2, и поэтому не наблюдается у мышей, несущих мутацию на чистом генетическом фоне линии C57BL/6. **Целью** данной работы является характеристика влияния мутации K72W на нервную и иммунную системы мыши и нахождение возможных механизмов модификации эффекта мутации, зависящих от генетического бэкграунда.

Для характеристики морфологии мозга K72W/K72W мышей был использован анализ гистологических и томографических изображений, а также цитофлуориметрический анализ инфильтрирующих клеток мозга. Оценка популяций иммунных клеток тимуса и селезенки гомозиготных мышей была произведена при помощи проточной цитофлуориметрии.

По результатам работы была подтверждена зависимость проявления фенотипа с нарушениями развития мозга и тимуса у гомозиготных особей от линиеспецифических генов-модификаторов: при скрещивании мышей, несущих мутацию K72W на чистом C57BL/6 бэкграунде, с мышами дикого типа линии 129S2 в поколении F₂ появляются особи, демонстрирующие аномалии развития. В дальнейших скрещиваниях было установлено, что аномальный фенотип проявляется примерно у 40% гомозигот, что указывает на наличие не менее двух генов-модификаторов. На основании литературных данных мы предположили, что такими модификаторами могут быть гены *Casp4*, *Birc6*, *Naip1-6*, однако проверка методом аллель-специфической ПЦР не установила соответствия между проявлением аномального фенотипа и носительством аллелей данных генов, специфичных для линии 129S2, в гомозиготном или гетерозиготном состоянии.

Аномальный фенотип гетерогенен и включает такие признаки, как разрастание клеток коры и базальных ганглиев головного мозга, гидроцефалию, уменьшение размера тимуса и увеличение популяции DN-тимоцитов. Аномальные признаки сочетаются независимо друг от друга: встречаются K72W/K72W мыши, со значительно измененной морфологией головного мозга и нормальным распределением популяций тимоцитов, и наоборот. Также мы показали, что несмотря на аномальное развитие головного мозга у части гомозигот K72W/K72W, экзонцефалия не приводит к нарушению гематоэнцефалического барьера и массовой инфильтрации иммунных клеток в головной мозг.

Полученные результаты указывают на важность исследования эффектов генетического бэкграунда в моделях генетических нокинов и нокауты. Мы планируем продолжить поиск генов-модификаторов апоптотического пути, определение которых может расширить существующее представление о механизмах апоптоза.

Работа была осуществлена при поддержке гранта Президента РФ для ведущих научных школ НШ-10014.2016.4.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ № 16-34-01216 мол-а.

ВИЗУАЛИЗАЦИЯ TNF *IN VIVO* С ПОМОЩЬЮ НАНОАНТИТЕЛ, СЛИТЫХ С БЕЛКОМ КАТУШКА

Горшкова Е.Н.¹, Южакова Д.В.^{1,2}, Василенко Е.А.¹, Ширманова М.В.², Ефимов Г.А.³, Ермакова К.Д.¹, Недоспасов С.А.^{1,4}, Астраханцева И.В.¹

¹ Национальный исследовательский Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского, Нижний Новгород, Россия

² Нижегородская государственная медицинская академия, Нижний Новгород, Россия

³ Гематологический научный центр, Москва, Россия

⁴ Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН, Москва, Россия

Введение. Фактор некроза опухоли (TNF) является провоспалительным цитокином, который играет важную

роль в нормальных физиологических процессах. Однако при многих аутоиммунных заболеваниях отмечается увеличение экспрессии TNF. В связи с этим важным для понимания роли TNF как в патологических, так и в нормальных процессах является выявление основных сайтов экспрессии этого цитокина. Применение методов прижизненной визуализации для изучения экспрессии TNF при аутоиммунных патологиях может открыть новые возможности в понимании биологии этого цитокина. Нами были получены конструкции, состоящие из наноконструкта против TNF человека и дальне-красного флуоресцентного белка Katushka (TurboFP635), которые могут претендовать на роль как флуоресцентных сенсоров, так и агентов для терапии TNF-зависимых патологий.

Цель и задачи. Оценить перспективы применения полученных конструкторов для визуализации TNF *in vivo*, исследуя уровень флуоресценции тела и органов, гуманизированных по гену TNF мышей в модели ЛПС/D-галактозамин (D-GalN)-индуцированной острой гепатотоксичности.

Материалы и методы. В работе использовались 2 флуоресцентных конструктора: нейтрализующий биологическую активность TNF белок NTN-Kat и связывающий TNF, но не блокирующий его биологическую активность белок BTN-Kat. Анти-TNF активность этих белков была оценена ранее по результатам *in vitro*- и *in vivo*-тестов. Белки вводили животным внутрибрюшинно (150 пМ/г веса животного). Затем через 30 минут животным внутрибрюшинно вводили ЛПС (400 нг/г веса) и D-GalN (800 мкг/г веса) либо PBS. Для оценки автофлуоресценции мышам вводили PBS за 30 мин до инъекции ЛПС/D-GalN. Флуоресцентный имиджинг животных и их органов проводился через 1 час, 3 часа и 6 часов после введения ЛПС на установке IVIS-Spectrum (Caliper Life Sciences, США) *ex vivo* в режиме регистрации эпифлуоресценции. Флуоресценцию возбуждали на длине волны 605/15 нм, регистрировали – на 660/10 нм. Для получения изображений животных шерсть удаляли машинкой для бритья и дополнительно проводили депиляцию кремом. При количественном анализе в программе LivingImage (Perkin Elmer) определяли усредненную по интересующей области интенсивность флуоресценции. В работе использовали трансгенных 750huTNFK1 мышей, полученных на генетической основе линии C57Bl/6, продуцирующих человеческий TNF вместо мышинного.

Результаты. Поскольку модель острой гепатотоксичности, индуцированная одновременным введением D-GalN и ЛПС, характеризуется воспалительным процессом в брюшной полости, как и ожидалось, наибольший уровень флуоресценции наблюдался при получении изображений животных со стороны живота. При этом через 1 час после введения ЛПС и D-GalN у мышей наблюдалось диффузное усиление сигнала (BTN-Kat – $1,83 \times 10^8$, NTN-Kat – $1,15 \times 10^8$ [p/s/cm²/sr]/[μW/cm²]) по сравнению с контрольными мышами, после введения PBS (BTN-Kat – $1,41 \times 10^8$, NTN-Kat – $2,55 \times 10^7$ [p/s/cm²/sr]/[μW/cm²]). Аналогичное увеличение сигнала через 1 час мы также наблюдали для органов, при этом наиболее интенсивной флуоресценцией обладали легкие (BTN-Kat – $3,83 \times 10^7$, NTN-Kat – $6,83 \times 10^7$ [p/s/cm²/sr]/[μW/cm²]), кишечник (BTN-Kat – $8,24 \times 10^7$, NTN-Kat – $6,68 \times 10^7$ [p/s/cm²/sr]/[μW/cm²]) и кожа (BTN-Kat – $6,19 \times 10^7$, NTN-Kat – $5,32 \times 10^7$ [p/s/cm²/sr]/[μW/cm²]). По результатам анализа сигнала через 6 часов после начала эксперимента мы могли наблюдать,

что у контрольных мышей, не стимулированных ЛПС и D-GalN, уровень флуоресценции BTN-Kat снижался до значения $9,76 \times 10^6$ (p/s/cm²/sr)/(μW/cm²), сопоставимого с аналогичным значением автофлуоресценции ($2,17 \times 10^7$ [p/s/cm²/sr]/[μW/cm²]), что, вероятно, свидетельствует о полном его выведении из организма. В то же время мы могли наблюдать накопление белка NTN-Kat как при оценке сигнала от животного со стороны живота ($7,04 \times 10^7$ [p/s/cm²/sr]/[μW/cm²]), так и при оценке органов (преимущественно легкие и кожа).

Заключение. Таким образом, можно сделать вывод, что использование белков BTN-Kat и NTN-Kat возможно для прижизненного изучения экспрессии TNF. При этом белок BTN-Kat способен быстро выводиться из организма, что характеризует его как эффективный сенсор с коротким временем жизни. В то же время белок NTN-Kat способен в свободном виде или в виде комплексов с TNF накапливаться в организме и сохранять при этом свою нейтрализующую активность, что было ранее подтверждено с помощью *in vivo*-тестов.

Работа выполнена при поддержке Грантов РФФИ № 16-34-00561, № 17-04-01478 и в рамках государственного задания (шифр проекта 20.6159.2017/П220).

ИЗУЧЕНИЕ РОЛИ IL-6 В ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ МОДЕЛИ АСТМЫ У МЫШЕЙ

Губернаторова Е.О.^{1,2}, Друзкая М.С.^{1,2},
Недоспасов С.А.^{1,2}, Туманов А.В.¹

¹ ФГБУН «Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта» РАН Москва, Россия

² Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

Частота и тяжесть хронических заболеваний легких, таких как аллергическая астма, растет с каждым годом, затрагивает от 200 до 300 миллионов человек. Первопричина, приводящая к развитию многих хронических заболеваний легких, остается неизвестной, и современные методы терапии астмы направлены преимущественно на облегчение симптомов. Таким образом, существует острая потребность в разработке новых методов лечения астмы. IL-6 представляет собой провоспалительный цитокин с плейотропными функциями – от гемопоэтической регуляции и регенерации тканей до индукции хронического воспаления и развития рака. Недавние исследования подтверждают связь IL-6 и воспаления в легких, следовательно, IL-6 может быть важной мишенью для терапии астмы (Doganci A. et al., 2005).

Цель. Изучение роли IL-6 в экспериментальной модели астмы у мышей, индуцированной белковым экстрактом из домашнего пылевого клеща (HDM, house dust mite).

Для исследования влияния IL-6 на аллергическое воспаление дыхательных путей нами была оптимизирована мышинная модель острой астмы (Blanchet M.R. et al., 2012). Сенсибилизирующее введение 1 мг HDM осуществляли за неделю до основного курса. Индукцию проводили посредством ежедневного интраназального введения HDM из расчета 0,5 мг/г веса мыши в течение 2 недель. Антитела против IL-6 мыши (из расчета 2,5/г веса мыши) вводили внутрибрюшинно перед каждой иммунизацией. Контрольной группе мышей вместо инъекции anti-IL-6 антител производили инъекции физиологического раствора. По окончании эксперимента

оценивали интенсивность и характер воспаления в легких, а также уровень провоспалительных цитокинов, ассоциированных с астмой.

В ходе данной работы было обнаружено, что, по сравнению с контрольными мышами, мыши, подвергавшиеся анти-IL-6 терапии, демонстрируют значительное снижение тяжести воспаления дыхательных путей. Подсчет иммунных клеток в тканях легких и бронхоальвеолярной жидкости, проведенный в конце эксперимента, показал снижение общего числа лимфоцитов в группе мышей, которым вводили антитела блокирующие IL-6. Кроме того, цитофлуориметрический анализ выделенных из легких и бронхоальвеолярной жидкости лимфоцитов выявил существенное снижение как доли, так и абсолютного числа гранулоцитов и патогенных при астме Th2-клеток у мышей на фоне анти-IL-6 терапии. Методом количественного ПЦР было установлено, что блокировка IL-6 приводила к снижению экспрессии активирующих цитокинов, таких как IL-4, IL-5, и IL-13, участвующих в индукции и поддержании воспаления при астме. Иммуноферментный анализ (ELISA) сыворотки и бронхоальвеолярной жидкости показал снижение уровня IgE, маркера астматического поражения легких, у мышей, подверженных anti-IL6 терапии по сравнению с контрольными мышами. Наконец, экспрессия муцина *Muc5ac* и маркера бокаловидных клеток *Gob5* была снижена на фоне анти-IL-6 терапии. Следует отметить, что медикаментозное подавление продукции слизи в дыхательных путях является одним из способов облегчения состояния при астме.

Таким образом, полученные данные свидетельствуют о том, что введение антител против IL-6 может снижать гиперреактивность дыхательных путей и аллергическое воспаление в мышинной модели HDM-индуцированной астмы. Данные результаты предоставляют рациональную основу для начала разработки терапии астмы, основанной на блокировке IL-6. Дальнейшие эксперименты необходимы для определения конкретного клеточного источника IL-6 в данной модели, а также с целью установления молекулярного механизма, определяющего патогенность этого цитокина в астме.

Работа была осуществлена при поддержке гранта РНФ 14-25-00160.

РАЗРАБОТКА ПРЕПАРАТА НА ОСНОВЕ ЭХИНОХРОМА А В КАЧЕСТВЕ СОПРОВОДИТЕЛЬНОЙ ТЕРАПИИ БЛЕОМИЦИН-ИНДУЦИРОВАННОГО ОКСИДАТИВНОГО СТРЕССА В ЛЕГКИХ НА РАННЕМ ЭТАПЕ ПОСТНАТАЛЬНОГО ОНТОГЕНЕЗА

Гусева О.Е., Лебедев О.А., Рыжовский Б.Я., Кузнецова М.С.

Хабаровский филиал ФГБНУ «Дальневосточный научный центр физиологии и патологии дыхания» – Научно-исследовательский институт охраны материнства и детства, Хабаровск, Россия

Введение. Блеомицин – смесь гликопептидных антибиотиков с цитостатическим эффектом, механизм действия которого связан со способностью вызывать фрагментацию молекул ДНК. Блеомицин входит в «золотые» стандарты терапии различных форм лимфогранулематоза у детей и подростков. Повсеместно известен его пневмотоксический эффект, который характеризуется развитием воспалительных и фибротических изменений. Одним из ключевых молекулярных механизмов формирования

и прогрессирования воспалительно-фиброзных процессов является оксидативный стресс, нарушающий баланс редокс-сенситивной регуляции апоптоза, пролиферации, дифференцировки, миграции мезенхимальных и эпителиальных клеток. Препараты на основе природного антиоксиданта Эхинохрома А (2,3,5,6,8-пента-гидрокси-7-этил-1,4-нафтохинон) в настоящее время широко используются в офтальмологии, кардиологии, неврологии.

Цель и задачи. Изучение влияния Эхинохрома А на показатели оксидативного стресса, индуцированного блеомицином, в легких крыс на раннем этапе постнатального онтогенеза. Исследование влияния Эхинохрома А на блеомицин-индуцированные нарушения процессинга свободных радикалов (СР) в легких крыс на раннем этапе постнатального онтогенеза.

Материалы и методы. Исследование проводилось в рамках программы фундаментальных исследований ДВО РАН «Новые лекарственные формы, биопрепараты и медицинские технологии, преимущественно на основе молекул и надмолекулярных комплексов из биологических объектов Дальнего Востока и Мирового океана», научный проект 15-1-5-030. Опыт поставлен на крысах линии Вистар. Животные были разделены на три группы. Первая группа – «блеомицин» – введение блеомицина крысам в возрасте 30 дней, однократное, внутрибрюшинное, в дозе 1 мг/кг. Вторая группа «блеомицин + эхинохром» – введение блеомицина, как и в первой группе, а также введение эхинохрома А через желудочный зонд в форме водного раствора, приготовленного extempore, в дозе 10 мг/кг в течение 5 суток (в день введения блеомицина, а также на 2, 3, 4 и 5-е сутки после этого). Третья группа – «контроль» – однократное внутрибрюшинное введение 30-дневным крысам физиологического раствора в эквивалентных блеомицину дозах. Для интегральной оценки процессов биогенеза СР в гомогенатах легочной ткани использовали метод хемилюминесценции (ХМЛ) на люминесцентном спектрометре LS 50B «PERKIN ELMER».

Результаты. Результаты ХМЛ-исследования легких крыс, повергнутых воздействию блеомицина, свидетельствовали о развитии выраженного оксидативного стресса. Зарегистрировано повышение генерации свободных радикалов в целом – показатель Ssp превышал аналогичный в группе «контроль» в 2,6 раза, при этом продукция супероксид-анион радикалов (Sluc), перекисных радикалов (Sind-1) возросла в 2,8 и 3,2 раза соответственно. Зарегистрирована интенсификация первичного этапа перекисного окисления липидов: концентрация гидроперекисей липидов (h) превышала значения в группе «контроль» в 3,1 раза. Нарушение процессинга СР сопровождалось ослаблением антиоксидантной антирадикальной защиты и снижением перекисной резистентности: величина Sind-2 возросла в 3,4 раза, амплитуда Н – в 3,2 раза соответственно. Известно, что Эхинохром А способен одновременно блокировать ряд звеньев свободнорадикальных реакций, действует как перехватчик активных форм кислорода, нейтрализует липопероксидные радикалы, хелатирует ионы металлов, ингибирует перекисное окисление липидов. Эти свойства были продемонстрированы им в данной экспериментальной модели – величины всех ХМЛ-параметров, характеризующих оксидативный статус в группе «блеомицин+эхинохром» (Ssp, Sluc, Sind-1, h, Sind-2, Н), были достоверно меньше, чем в группе «блеомицин» – в 1,9; 2,0; 1,9; 2,0; 2,4; 2,3 раза соответственно.

Заключение. Признанной стратегией фармакотерапии при пневмофиброзе является коррекция локальных проявлений оксидативного стресса (Walters D.M., Cho H.Y., 2014). Полученные нами результаты согласуются с данной стратегией, расширяя возможности для создания на основе Эхинохрома А официального препарата для патогенетической и сопроводительной терапии в детской пульмонологической и онкологической практике.

ВЛИЯНИЕ БАКТЕРИАЛЬНОЙ БИОПЛЕНКИ НА ФОРМИРОВАНИЕ НЕЙТРОФИЛЬНЫХ ВНЕКЛЕТОЧНЫХ ЛОВУШЕК

Долгушин И.И., Шишкова Ю.С., Колесников О.Л., Пичугов С.М., Галагудин И.В.

ФГБОУ ВО «Южно-Уральский государственный медицинский университет», Челябинск, Россия

Введение. Первой линией защиты от микроорганизмов выступает врожденная противоинфекционная система макроорганизма, самыми многочисленными клетками которой являются нейтрофилы. Нейтрофилы, выходя из периферической крови в ткани и на поверхность слизистых оболочек, участвуют в антимикробных и воспалительных реакциях. Известно, что бактерии существуют в виде биопленки, обладая повышенной по сравнению с планктонными культурами устойчивостью к экстремальным физико-химическим условиям среды и биологическим факторам (неблагоприятной температуре, рН, концентрации соли, антимикробным веществам, фагоцитозу). Несмотря на многочисленные исследования антибиопленочных реакций врожденного иммунитета роль внеклеточного матрикса в формировании нейтрофильных внеклеточных ловушек остается невыясненной.

Цель. Определить влияние бактериальной биопленки на формирование нейтрофильных внеклеточных ловушек.

Задачи. 1) Оценить *in vitro* влияние планктонной культуры *E. coli* и ее биопленки на формирование нейтрофильных внеклеточных ловушек. 2) Определить *in vivo* способность нейтрофильных гранулоцитов к формированию нейтрофильных внеклеточных ловушек до и после хирургической обработки инфицированной ожоговой раны.

Материалы и методы. Для решения первой задачи использовали взвесь суточной и 3-суточной культуры *E. coli* и нейтрофилы, выделенные из периферической крови условно-здоровых доноров на двойном градиенте фиколла-верографина. Исследование проводили в 5 повторях. Результаты взаимодействия изучали с помощью люминесцентной микроскопии при окраске акридиновым оранжевым. Для решения второй задачи было проведено цитологическое исследование препаратов раневого отделяемого, окрашенных по Романовскому–Гимзе, до и после выполнения хирургической обработки ожоговых ран 15 пациентов с помощью аэрозольной струи 0,05% раствора хлоргексидина биглюконата под давлением воздушного потока. В цитологических препаратах изучали содержание нейтрофильных гранулоцитов в поле зрения и определяли процентное содержание нейтрофильных внеклеточных ловушек от 100 просмотренных морфологических форм нейтрофилов с помощью световой микроскопии при увеличении 100×10×2. Полученные результаты были подвергнуты статистической обработке.

Результаты. В результате проведенных исследований установили, что после 3-минутного взаимодействия су-

точной культуры *E. coli* со взвесью донорских нейтрофилов происходило формирование нейтрофильных внеклеточных ловушек, через 30 минут совместного культивирования *in vitro* 95% нейтрофильных гранулоцитов экстрагировали свою ДНК. Иначе выглядела морфология нейтрофильных гранулоцитов при взаимодействии с 3-суточной культурой *E. coli*. В препаратах микроорганизмы были представлены плотно упакованными клетками, напоминающими кукурузные початки, а нейтрофилы сохраняли морфологию сегментоядерных гранулоцитов в течение 40 минут наблюдения и не формировали нейтрофильные внеклеточные ловушки.

При изучении цитологических препаратов раневого отделяемого до проведения хирургической обработки в поле зрения визуализировалось $9,01 \pm 1,38$ нейтрофилов, после обработки $4,94 \pm 0,88$ ($p = 0,04$). Процентное содержание нейтрофильных внеклеточных ловушек до обработки составляло $40,94 \pm 5,55\%$, а после – $59,91 \pm 5,70\%$ ($p = 0,01$)

Заключение. Таким образом, при взаимодействии биопленки *E. coli* и нейтрофильных гранулоцитов в эксперименте *in vitro* показано отсутствие формирования нейтрофильных внеклеточных ловушек. В то же время на примере использования хирургической обработки инфицированной ожоговой раны, при которой происходит механическое разрушение биопленки аэрозольной струей, высвобождение планктонных форм микроорганизмов и представление незащищенных бактериальных клеток тканевым нейтрофилам, было обнаружено интенсивное формирование нейтрофильных внеклеточных ловушек.

ВЛИЯНИЕ САПОЗИНА D НА ФОРМИРОВАНИЕ ПРОТИВОТУБЕРКУЛЕЗНОГО ИММУНИТЕТА ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ТУБЕРКУЛЕЗНОЙ ИНФЕКЦИИ

Евстифеев В.В., Шепелькова Г.С., Еремеев В.В.

ФГБНУ «Центральный научно-исследовательский институт туберкулеза», Москва, Россия

Сапозины (Sap) – подгруппа гликопротеинов большого семейства сапозин-подобных белков. Сапозины А, В, С и D образуются в кислых эндосомах путем расщепления просапозина (pSap). Сапозины участвуют в процессе презентации антигенов микобактерий на молекулах CD1. Ранее было показано, что макрофаги, полученные от мышей-нокаут по гену pSAP, подавляли рост *M. tuberculosis* слабее, чем макрофаги мышей дикого типа. При добавлении к культуре клеток рекомбинантного человеческого сапозина D (Sap-D) наблюдалось полное восстановление функций макрофагов. При инкубации *M. tuberculosis* с рекомбинантными Sap наблюдалось подавление метаболизма бактерий, причем наибольшей активностью обладал Sap-D. Методами флуоресцентного мечения и электронной микроскопии было обнаружено повреждающее действие Sap-D на мембрану *M. tuberculosis*. Результаты экспериментов, проведенных в лаборатории, позволяют сделать вывод, что Sap-D является важным компонентом в формировании иммунного ответа к туберкулезу (ТБ). Однако неясно как влияет дефицит Sap-D на формирование противотуберкулезного иммунного ответа *in vivo* у мышей при экспериментальной туберкулезной инфекции.

Мышей C57BL/6 (B6) и B6.Sap-D^{-/-} аэрозольно инфицировали вирулентным штаммом *M. tuberculosis* H37Rv. Через 3 и 5 недель после инфицирования исследовали степень поражения легочной ткани и рост микобактерий в легком.

Было показано, что у B6.Sap-D^{-/-} микобактериальная нагрузка легочной ткани и селезенки достоверно выше, чем у мышей B6 как через три, так и через пять недель после инфицирования. Анализ клеточного состава легочной ткани показал, что для «наивных» Sap-D^{-/-} по сравнению с мышами дикого типа (B6) характерно меньшее количество макрофагов как в легочной ткани, так и в селезенке. Причем через три недели после инфицирования *M. tuberculosis* H37Rv содержание макрофагов у нокаут по сапозину D и мышей дикого типа в легких выравнивается, а в селезенке различия сохраняются. Через пять недель после инфицирования количество макрофагов у мышей нокаут достоверно выше, чем у B6. Также было показано, что через пять недель после заражения мыши B6.Sap-D^{-/-} отличаются от мышей дикого типа большей инфильтрацией легочной ткани, большим количеством нейтрофилов. Исследование чувствительности к апоптозу клеток легочной ткани Sap-D мышей и мышей дикого типа показало, что содержание апоптотических клеток в легких мышей нокаут по сапозину D через три и пять недель после инфицирования достоверно выше, чем у мышей линии B6.

Итак, дефицит Sap-D существенно усиливает воспаление при экспериментальной туберкулезной инфекции, а также влияет на предрасположенность к апоптозу.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (грант № 15-04-05519).

УРОВЕНЬ ЦИТОКИНЕМИИ ПРИ АЛЛОКСАНОВОМ САХАРНОМ ДИАБЕТЕ У КРЫС И ЕГО КОРРЕКЦИИ СОЕДИНЕНИЕМ РЯДА 1,3,4-ТИАДИАЗИНА

Емельянов В.В.¹, Булавинцева Т.С.^{1,2}, Сидорова Л.П.¹, Цейтлер Т.А.¹, Чупахин О.Н.¹, Черешнев В.А.^{1,2}

¹ ФГАОУ ВО «Уральский федеральный университет им. первого Президента России Б.Н. Ельцина», Екатеринбург, Россия

² ФГБУН «Институт иммунологии и физиологии УрО РАН», Екатеринбург, Россия

Введение. Метаболические нарушения при сахарном диабете (СД) в эксперименте и клинике существенно изменяют продукцию про- и противовоспалительных цитокинов клетками иммунной системы. Выявлена роль провоспалительных цитокинов в повреждении сосудистого эндотелия и развитии диабетических ангиопатий. Предшествующими исследованиями показана способность соединений ряда 1,3,4-тиадиазина корректировать метаболические нарушения при аллоксановом СД у крыс, а также изменять течение воспалительной реакции при экспериментальном панкреонекрозе и инфаркте миокарда.

Цель и задачи. Оценить уровень цитокинемии при развитии аллоксанового СД у крыс и его коррекции соединением ряда 1,3,4-тиадиазина.

Материалы и методы. Эксперименты выполнены на 30 крысах-самцах линии Wistar массой 210-250 г в соответствии с этическими нормами Директивы Совета ЕС 2010/63. СД моделировали введением аллоксана по ранее разработанной методике в течение 3 суток в суммарной дозе 300 мг/кг массы животного. Синтетическое соединение L-17 ряда 1,3,4-тиадиазина и вещество сравнения липоевую кислоту (ЛК, препарат «Октолипен», Россия) вводили внутримышечно в дозе 40 мг/кг массы животного 3 раза в неделю в течение 4 недель. На 30-е сутки эксперимента в крови крыс определяли содержание интерлейкинов (IL) IL-1 α , IL-6 и IL-10 методом ИФА наборами

фирмы «Thermo Scientific» на автоматическом анализаторе «LAZURITE AUTOMATED ELISA SYSTEM».

Результаты. Развитие СД у крыс приводило к статистически значимому повышению концентрации IL-1 α , IL-6 и IL-10 от 1,1 до 3,6 раз по сравнению с интактными животными. Введение ЛК частично корригировало показатели цитокинемии, снижая концентрации IL-6 и IL-1 α до уровня интактных животных, при этом концентрация IL-10 продолжала оставаться повышенной. Наиболее полной коррекции цитокинемии удалось достичь соединением L-17, введение которого приводило к снижению концентраций всех исследованных цитокинов до уровня интактных крыс.

Заключение. Полученные результаты свидетельствуют об участии иммунологических механизмов в корригирующем действии соединения ряда 1,3,4-тиадиазина при аллоксановом СД у крыс.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ № проекта 16-15-00039.

ВЛИЯНИЕ АУТОПРОБИОТИКОВ НА ИММУНИТЕТ ПРИ КОРРЕКЦИИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО ДИСБИОЗА

Ермоленко Е.И.^{1,2}, Котылева М.П.¹, Кудрявцев И.В.¹, Лавренова Н.С.¹, Крамская Т.А.¹, Леонтьева Г.Ф.¹, Куляшова Л.Б.³, Суворов А.Н.^{1,2}

¹ ФГБУН «Институт экспериментальной медицины», Санкт-Петербург, Россия

² Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия

³ Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Пастера, Санкт-Петербург, Россия

Дисбиоз кишечника корректируется при помощи пробиотиков, полезных бактерий, как правило, выделенных из пищевых продуктов или организма здоровых людей и животных. Однако использование пробиотиков в ряде случаев бывает недостаточно эффективным и кратковременным. Индигенные, или собственные, бактерии (аутопробиотики) имеют ряд преимуществ, связанных с наличием по отношению к ним иммунологической толерантности и отсутствием у них выраженной антагонистической активности к облигатным представителям микробиоты. До сих пор методология создания аутопробиотических препаратов окончательно не разработана. Во многом выбор состава аутопробиотиков связан с особенностями их влияния на иммунитет. **Целью** данного исследования явилось сравнение иммуномодулирующего эффекта различных по составу аутопробиотиков после введения крысам при дисбиозе кишечника.

В эксперименте использованы 5 групп крыс (самцы, Вистар). Индукция дисбиоза осуществлена введением ампицилина и метронидазола в течение трех дней. Затем животные в течение 5 дней получали индигенные бифидобактерии (группа Б), энтерококки (группа Е), консорциум аутопробиотических микроорганизмов, выращенных в анаэробных условиях (группа А) или фосфатный буфер (группа К1). Крысы из второй контрольной группы (К2) получали воду и фосфатный буфер. На 9-ый день эксперимента пробы крови и биоптаты селезенки исследованы при помощи проточной цитометрии клеток, окрашенных комбинацией флуоресцентно меченых моноклональных антител к CD3⁺, CD4⁺, CD8⁺, CD161⁺, FoxP3⁺ и CD45RA⁺ маркерам (Biolegend, США). Был использован проточный

цитометр Navios™ (Beckman Coulter). Фагоцитарную активность лейкоцитов периферической крови оценивали, анализируя особенности их взаимодействия со смесью стафилококков. Содержание цитокинов в сыворотке крови (IL-10, MCP-1 и TGF-β) определяли, используя тест-системы для ИФА (Bender MedSystems, США). Исследование иммунных клеток крови выявило снижение количество NK (CD3⁺CD161⁺) клеток в группе Б по сравнению с другими группами крыс. При этом процентное содержание NKT (CD3⁺CD161⁺) было выше у животных, у которых коррекция дисбиоза не проводилась (группа К1). При анализе биоптатов селезенки обращало на себя внимание низкое содержание FoxP3⁺CD25⁺ лимфоцитов у животных из группы К1 (по сравнению с остальными крысами) на фоне повышения содержания этой популяции клеток в группах А, Б и Е по сравнению с К2. Выявлена тенденция к снижению пула В-лимфоцитов (CD45RA⁺) в селезенке животных из групп Е и А. Содержание противовоспалительного и регуляторного цитокина IL-10 в сыворотке крови было минимальным в группе К1, а в группах Б и Е содержание IL-10 было выше, чем у крыс из групп А и К2. Не было обнаружено достоверных различий в количестве MCP-1 и TGF-β в сыворотке крови животных из различных групп. Фагоцитарная активность лейкоцитов периферической крови была наиболее низкой у крыс из группы К1 и у крыс из групп А и Б, однако она была выше, чем в группе К2. Таким образом, выявлены общие тенденции и специфические особенности изменений в иммунитете при коррекции дисбиотических нарушений с использованием аутопробиотических энтерококков, бифидобактерий и анаэробного консорциума. Последний воспроизводит положительные эффекты нескольких моноштаммовых аутопробиотиков.

Работа поддержана грантом РФФ № 16-15-10085.

ЭКСПРЕССИЯ HLA-DR НА НК-КЛЕТКАХ АССОЦИИРОВАНА ПРЕИМУЩЕСТВЕННО С МЕНЕЕ ДИФФЕРЕНЦИРОВАННЫМИ КЛЕТКАМИ С ПОВЫШЕННОЙ ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ АКТИВНОСТЬЮ

Ерохина С.А., Стрельцова М.А., Каневский Л.М., Коваленко Е.И.

Институт биоорганической химии РАН, Москва, Россия

В норме в периферической крови человека содержится небольшая доля НК-клеток, экспрессирующих HLA-DR, которая увеличивается при стимуляции НК-клеток IL-2 *in vitro*. *In vivo* повышенный уровень HLA-DR⁺ НК-клеток регистрируется при определенных патологических состояниях, таких как иммунодефицит на фоне HIV-инфекции, рассеянный склероз, IgA-нефропатия. Функциональное значение этой молекулы на НК-клетках все еще обсуждается: есть доказательства того, что НК-клетки могут использовать HLA-DR для презентации антигенов, в других работах HLA-DR рассматривается как маркер активации или пролиферации НК-клеток. **Целью** данной работы было изучение взаимосвязи между экспрессией HLA-DR и стадиями развития НК-клеток, а также их функциональной активностью. Работа проводилась на свежeweделенных НК-клетках и клетках, полученных в системе активации *in vitro* с использованием IL-2 и клеток K562, экспрессирующих мембраносвязанный IL-21 (K562-mbIL21). Данная комбинация стимулов используется для наращивания НК-клеток в целях иммунотерапии.

Анализ экспрессии HLA-DR на различных стадиях дифференцировки свежeweделенных НК-клеток по-

казал, что в целом доля HLA-DR-позитивных клеток в периферической крови была значительно выше среди менее дифференцированных НК-клеток CD56^{bright}, чем среди относительно более зрелых клеток CD56^{dim}. Однако у некоторых людей наблюдалась достаточно высокая доля HLA-DR-положительных НК-клеток в терминально дифференцированной субпопуляции CD56^{dim}CD57⁺ (группа 2). Индивидуумы из группы 2 также показали более высокий уровень NKG2C⁺ НК-клеток в HLA-DR-положительной субпопуляции по сравнению с HLA-DR-отрицательной. CD56^{dim}CD57⁺NKG2C⁺ фенотип указывает на то, что экспрессия HLA-DR может быть в данном случае связана с так называемыми НК-клетками памяти. Функциональный тест показал, что свежeweделенные HLA-DR-позитивные НК-клетки продуцируют IFN γ интенсивнее, чем HLA-DR-отрицательные, как в субпопуляции CD56^{bright}, так и в субпопуляции CD56^{dim}.

При стимуляции свежeweделенных НК-клеток IL-2 и K562-mbIL21, но не растворимым IL-21, мы наблюдали многократное увеличение доли HLA-DR-положительных НК-клеток. Помимо увеличения экспрессии HLA-DR, большинство НК-клеток после 6 дней стимуляции демонстрировали фенотип CD56^{bright}CD57⁺NKG2A⁺, который характеризует «ранние» НК-клетки. Кроме того, после стимуляции IL-2 и K562-mbIL21 НК-клетки HLA-DR⁺ все так же демонстрировали более интенсивную продукцию IFN γ по сравнению с клетками HLA-DR⁻.

Таким образом, как в состоянии покоя, так и после активации экспрессия HLA-DR в основном была ассоциирована с менее зрелыми НК-клетками. Однако ее также можно обнаружить *in vivo* в терминально дифференцированных НК-клетках. Происхождение и особенности данной субпопуляции HLA-DR⁺CD56^{dim}CD57⁺ еще предстоит выяснить. HLA-DR-позитивные НК-клетки как *ex vivo*, так и после стимуляции IL-2 и K562-mbIL21 характеризовались повышенной способностью к продукции IFN γ .

Работа выполнена при поддержке РФФИ, грант № 16-34-00836.

ВОСПАЛИТЕЛЬНЫЙ ФЕНОТИП ФИБРОБЛАСТОПОДОБНЫХ СИНОВИОЦИТОВ КОРРЕЛИРУЕТ С ТЯЖЕстью ЗАБОЛЕВАНИЯ В ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ МОДЕЛИ АНТИТЕЛО-ЗАВИСИМОГО АРТРИТА У МЫШЕЙ

Жданова А.С.^{1,2}, Гоголева В.С.^{1,2}, Зварцев Р.В.^{1,2}, Недоспасов С.А.^{1,2}, Друзцкая М.С.^{1,2}

¹ *ФГБУН «Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта» РАН, Москва, Россия*

² *Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия*

Ревматоидный артрит (РА) — хроническое воспалительное аутоиммунное заболевание, приводящее к прогрессирующему повреждению суставных и околосуставных структур, которое характеризуется образованием аутоантител и синовиальной гиперплазией. Важную роль в процессе разрушения суставов играют фибробластоподобные синовиоциты (FLS). В норме их функция заключается в производстве внеклеточных матриксных компонентов, которые поддерживают нормальный состав синовиальной жидкости и суставную поверхность. Однако показано, что во время воспалительного процесса эти клетки приобретают патогенный фенотип (Hardy R.S. et al., 2013). Активированные цитокинами FLS являются главным источником IL-6 и других

цитокинов, хемокинов, а также молекул адгезии и металлопротеиназ, способствуя активации остеокластов, миграции и пролиферации клеток иммунной системы в очаг воспаления, что приводит к разрушению хрящевой и костной ткани (Шнайдер М.А. и соавт., 2016). Несмотря на растущий интерес к фибробластоподобным синовиоцитам и их роли в патогенезе РА, большинство работ произведено на культурах клеток, полученных от больных пациентов (Crowley T. et al., 2017). Следовательно, изучение провоспалительных свойств FLS, выделенных из мышечных суставов, *in vitro* остается актуальной проблемой и имеет особый интерес не только для лучшего понимания патологии в экспериментальных моделях воспалительных заболеваний суставов, но также может представлять интерес для изучения новых подходов антицитокиновой терапии.

Цель. Изучить патогенный фенотип FLS, выделенных из воспаленных суставов мышей, больных артритом, в сравнении с фибробластоподобными синовиоцитами, полученными от здоровых доноров.

В работе сравнивали культуры FLS, полученные от мышей дикого типа и мышей, дефицитных по TNF, в экспериментальной модели антитело-зависимого артрита. На четвертом пассаже первичные клеточные культуры стимулировали TNF и оценивали уровень экспрессии генов методом ПЦР в реальном времени в культурах, полученных из здоровых и артритных мышечных суставов. Также был произведен анализ продукции IL6 культурами после стимуляции TNF и без нее методом иммуноферментного анализа (ELISA).

Было установлено, что активированные TNF фибробластоподобные синовиоциты от артритных мышей характеризуются повышенной экспрессией провоспалительных цитокинов, хемокинов и молекул адгезии в сравнении с FLS из здоровых суставов. При этом было обнаружено, что у фибробластоподобных синовиоцитов, полученных от TNF KO мышей, в которых был индуцирован артрит, уровень продукции IL-6 значительно снижен относительно артритной культуры дикого типа, но превышает уровень его продукции у FLS из здоровых суставов, что коррелирует с отсутствием внешних признаков развития артрита и пониженной продукцией системного IL-6 у TNF-дефицитных мышей.

Полученные результаты подтверждают, что мышечные фибробластоподобные синовиоциты сохраняют патологический фенотип на протяжении нескольких пассажей, и в дальнейшем культуры FLS, полученные из артритных суставов мышей, можно использовать для изучения и создания новых подходов анти-цитокиновой терапии ревматоидного артрита.

Работа была осуществлена при поддержке РФФИ 14-25-00160.

РОЛЬ КАТЕПСИНА G В МОДУЛЯЦИИ ИММУННЫХ РЕАКЦИЙ С УЧАСТИЕМ ЛОКАЛЬНЫХ РЕНИН-АНГИОТЕНЗИНОВЫХ СИСТЕМ

Замолодчикова Т.С.¹, Толпыго С.М.¹,
Свищевская Е.В.²

¹ Научно-исследовательский институт нормальной физиологии им. П.К. Анохина, Москва, Россия

² Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва, Россия

Многофункциональная сериновая протеаза иммунных клеток катепсин G (Кат G), обладающая необычной

двойной трипсино- и химотрипсиноподобной специфичностью, синтезируется в нейтрофилах, моноцитах и тучных клетках. Кат G воздействует на функциональное состояние иммунных клеток, способствует миграции нейтрофилов и нейтрализации антигенов и считается фактором поддержания равновесия между защитой ткани и ее повреждением в условиях воспаления. Кат G является также компонентом ренин-ангиотензиновой системы (РАС), способен активировать ренин и обладает ангиотензин-превращающими свойствами. Ангиотензин-II (А-II) является одним из ключевых медиаторов воспаления и, в качестве иммуномодулятора, может активировать инфильтрацию иммунокомпетентных клеток, воздействовать на клеточную пролиферацию, дифференцировку и хемотаксис. Локальная РАС слизистой тонкого кишечника представлена полным набором компонентов, локализованных, преимущественно в покровном эпителии, собственной пластинке (*lamina propria*) и мышечной пластинке (*muscularis mucosae*). Клетки иммунной защиты слизистой (нейтрофилы, тучные клетки, Т-лимфоциты) экспрессируют собственную клеточную РАС. Регуляция всех уровней функциональной активности кишечника осуществляется при непосредственном участии локальной РАС. Для установления возможной роли катепсина G в модуляции иммунных реакций с потенциальным участием ренин-ангиотензиновой системы, была проведена иммуногистохимическая локализация катепсина G в слизистой оболочке двенадцатиперстной кишки (СОДПК) человека при отсутствии клинически выраженного воспаления и при воспалении (дуоденит II-III степени). В работе использовали моноклональные антитела к Кат G, меченые FITC и к компоненту рецептора CD14 (Novus Biologicals, USA). Биоптаты дуоденальной слизистой оболочки были получены в ходе эндоскопического обследования пациентов (диагноз – поверхностный проксимальный гастрит, дуодено-гастральный рефлюкс) с их информированного согласия.

В результате исследования были выявлены новые клеточные источники биосинтеза Кат G в СОДПК: межэпителиальные лимфоциты, лимфоциты собственной пластинки слизистой оболочки, большие глобулярные лимфоциты, кишечные макрофаги и специализированные эпителиоциты кишечных желез – клетки Панета. Биосинтез Кат G показан также в тучных клетках. В нашем исследовании мы впервые показали, что Кат G, традиционно рассматриваемый как один из эффекторов воспалительного процесса, конститутивно синтезируется в нормальной СОДПК, не имеющей клинически выраженных признаков воспаления. Полученные данные позволяют отнести Кат G к основным протеазам местного кишечного иммунитета. При воспалении уровень экспрессии катепсина G значительно возрастает за счет инфильтрата. В ходе двойного окрашивания биопсии воспаленной СОДПК антителами, специфичными к Кат G и к CD14 была выявлена ко-локализация Кат G и CD14 в значительной части иммунных клеток воспаленной слизистой оболочки, которые были идентифицированы как нейтрофилы и макрофаги. В некоторых случаях Кат G -специфическая флуоресценция обнаруживается на щеточной кайме энтероцитов и секрете бокаловидных клеток. В цитоплазме энтероцитов эпизодически встречаются мелкие гранулы, окрашивающиеся Кат G -специфическими антителами, что может быть следствием всасывания Кат G, сорбированного на щеточной кайме энтероцита путем эндоцитоза. Сорбция Кат G на щеточной

кайме и на слизистом секрете бокаловидных клеток указывает на возможность непосредственного контакта этой протеазы с имеющимися в этой зоне потенциальными субстратами, в том числе, проренином и ангиотензиногеном, что предполагает существование Кат G-зависимого пути активации локальной кишечной РАС.

Таким образом, каталитические свойства и клеточная локализация предполагают существование Кат G-зависимого пути активации локальной РАС в кишечном эпителии в норме. В условиях воспаления локальная РАС может дополняться нейтрофил-зависимой ангиотензин-генерирующей системой, инициирующей в очаге воспаления образование ангиотензинов, в том числе А-II, воздействующего на кровоток, проницаемость сосудов и инфильтрацию клеток, что, по-видимому, играет компенсаторную роль в экстремальных условиях.

ФАГОЦИТАРНАЯ АКТИВНОСТЬ ПЕРИТОНЕАЛЬНЫХ КЛЕТОК КРЫС ПРИ ТИРЕОТОКСИКОЗЕ В ЭФФЕКТОРНУЮ ФАЗУ ИММУННОГО ОТВЕТА

Зенков А.Л.¹, Годовалов А.П.¹, Шилов Ю.И.^{1,2}

¹ ФГБОУ ВО «Пермский государственный медицинский университет им. акад. Е.А. Вагнера» Министерства здравоохранения РФ, Пермь, Россия

² ФГБУН «Институт экологии и генетики микроорганизмов» УрО РАН, Пермь, Россия

Ранее выявлена зависимость направленности изменений иммунного ответа от тяжести экспериментального тиреотоксикоза у крыс и участие в них функциональной экспрессии бета-адренорецепторов (Годовалов А.П., Шилов Ю.И., 2009; Шилов Ю.И., Годовалов А.П., 2012). Однако изменения функций перитонеальных лейкоцитов при тиреотоксикозе изучены недостаточно.

Цель. Оценка количественного состава и фагоцитарной активности перитонеальных клеток крыс при экспериментальном тиреотоксикозе в эффекторную фазу иммунного ответа.

Материалы и методы. Эксперимент выполнен на 33 самцах белых крыс с исходной средней массой 313 ± 4 г. Для моделирования тиреотоксикоза ежедневно подкожно вводили L-тироксин в течение 14 дней в суточной дозе 0,04 (1-я группа) или 4 мг/кг массы тела (2-я группа) (Годовалов А.П., Шилов Ю.И., 2009; Шилов Ю.И., Годовалов А.П., 2012). Крысы контрольной группы получали растворитель гормона. На 10-е сутки от начала эксперимента всех животных сенсibilизировали эритроцитами барана (108 клеток подкожно в правую стопу). На 4-е сутки после сенсibilизации вводили разрешающую дозу антигена (109 эритроцитов подкожно в правую стопу). Через 24 ч (15-е сутки эксперимента) оценивали количественный состав перитонеальных клеток и их фагоцитарную активность по отношению к формализированным эритроцитам барана по ранее описанному методу (Шилов С.Ю., Шилов Ю.И., 2012). Статистический анализ результатов проводили с использованием методов описательной статистики и критерия Дункана для множественных сравнений.

Результаты. Установлено, что у животных 1-й группы абсолютное число всех перитонеальных лейкоцитов составляет $164,2 \pm 2,7$ ($p < 0,05$), у крыс 2-й группы – $104,0 \pm 8,9$ ($p > 0,05$), а в контрольной группе – $132,1 \pm 15,6$ млн клеток. У животных 1-й группы выявляется увеличение абсолютного числа перитонеальных лимфоцитов ($85,0 \pm 5,6$ млн

клеток, а в контрольной – $51,6 \pm 7,7$ млн клеток; $p < 0,05$). Абсолютное количество перитонеальных мононуклеарных фагоцитов, нейтрофильных гранулоцитов и тучных клеток в сравниваемых группах статистически значимо не различается. При оценке фагоцитарной активности перитонеальных клеток установлено, что во 2-й группе существенно выше абсолютное число активно фагоцитирующих клеток, чем в контрольной и 1-й группах. Выявленные изменения фагоцитарной активности перитонеальных клеток связаны, в первую очередь, с изменением фагоцитарной активности мононуклеарных фагоцитов.

Заключение. Таким образом, при экспериментальном тиреотоксикозе, вызванном подкожным введением тирокина в суточной дозе 4 мг/кг массы тела, отмечается повышение фагоцитарной активности перитонеальных лейкоцитов преимущественно за счет мононуклеарных фагоцитов.

ВЛИЯНИЕ ЛОКАЛЬНОГО ВВЕДЕНИЯ ЦИТОКИНОВЫХ ИММУНОМОДУЛЯТОРОВ НА РОСТ ПЕРЕВИВАЕМОЙ МЕЛАНОМЫ МЫШЕЙ

Золотарева Е.И., Златник Е.Ю., Шульгина О.Г., Новикова И.А., Быкадорова О.В.

ФГБУ «Ростовский научно-исследовательский онкологический институт» Министерства здравоохранения РФ, Ростов-на-Дону, Россия

Введение. Цитокиновые препараты нашли применение в комплексном лечении злокачественных опухолей, в частности меланомы, однако их введение осуществляется преимущественно системно. Тем не менее, при проведении иммунотерапии, наряду с системным действием представляется возможным использовать и локальные эффекты цитокинов, способствующие коррекции микроокружения опухоли. Кроме того, оптимизация комбинаций цитокиновых препаратов для максимального проявления их противоопухолевого и иммуномодулирующего действия рассматривается как важное направление иммунотерапии опухолей.

Цель. Разработка и экспериментальное обоснование новых методов иммунотерапии перевиваемой меланомы с применением цитокиновых препаратов.

Материалы и методы. Эксперимент поставлен на 75 мышах линии С57Bl/6 с перевиваемой меланомой В16, у которых после паратуморального введения в течение 8 дней различных комбинаций препаратов рекомбинантных цитокинов изучали динамику опухолевого роста. После эвтаназии, которую проводили через 3 дня, оценивали метастазирование в легкие и селезенку, морфологические характеристики меланомы, селезенки и тимуса, состав субпопуляций лимфоцитов в селезенке с помощью точной цитофлюориметрии. Исследовали 6 групп животных-опухоленосителей, получавших Ронколейкин (IL-2), Ронколейкин + Доксорубин, Ронколейкин + Ингарон (IFN γ), Ронколейкин + Ингарон + Рефнот (TNF α с тимозином), цитостатик Доксорубин (внутрибрюшинно); контроль (физиологический раствор). Суммарные дозы препаратов рассчитывали, исходя из клинически рекомендованных в пересчете на массу тела мышей (18-20 г): Ронколейкин и Ингарон по 1200 МЕ, Рефнот 400 МЕ, доксорубин 32 мкг.

Результаты. Оптимальной комбинацией оказалась Ронколейкин + Ингарон, которая как в ходе введения, так и после его окончания вызывает торможение роста опухоли на

30–38% по сравнению с контролем. При применении данной комбинации наблюдается выраженный (100%) анти-метастатический эффект, т. е. полное отсутствие метастазов у животных, тогда как в контрольной группе они выявлены у 60% мышей в количестве 12 (9 в легких и 3 в селезенке). Торможение роста опухоли сопровождается морфологически регистрируемыми дистрофическими изменениями опухолевых клеток и выраженной лейкоцитарной инфильтрацией. Морфологическое исследование тимуса выявило развитое корковое вещество с плотным расположением тимоцитов, что свидетельствует об активном состоянии Т-клеточного звена иммунитета, которое подтверждается результатами субпопуляционного анализа спленоцитов: содержание Т-клеток было выше контроля ($60,33 \pm 1,42\%$ против $46,1 \pm 2,06\%$) за счет Th. При этом уровень Th у мышей данной группы был максимальным среди животных всех групп, составляя $47,9 \pm 1,5\%$, тогда как в других он колеблется от 15 до 35%. Все указанные различия статистически достоверны, $p < 0,05$. По-видимому, стимуляция Т-клеточного звена в данной группе происходит преимущественно под действием Ронколейкина, который обнаруживает аналогичный эффект и при паратуморальном введении в монорегиме. Однако введение одного Ронколейкина не вызывает торможения роста опухоли и только частично ингибирует развитие метастазов. Добавление к комбинации Ронколейкин + Ингарон третьего иммуномодулятора Рефнота не приводит к дальнейшей положительной динамике: анти-метастатический эффект сохраняется, но составляет 95,4% на фоне незначительного торможения роста меланомы. Сравнение групп, получавших Доксорубин в монорегиме и Доксорубин с Ронколейкином, показывает, что Ронколейкин усиливает торможение опухолевого роста как в процессе введения (-27 против $-16,2\%$), так и на момент эвтаназии ($-11,55$ против $+1,9\%$), но не оказывает значимого влияния на метастазирование в данной комбинации. Иммунологические показатели в комбинации Ронколейкин + Доксорубин обнаруживают динамику, аналогичную таковой в других группах, получавших Ронколейкин (повышение уровня Т-клеток за счет Th и снижение В-клеток по сравнению с контролем), в то время как Доксорубин вызывает депрессию Т-клеточного звена.

Заключение. Проведенные исследования свидетельствуют об антиметастатическом и иммуномодулирующем эффекте паратуморального применения комбинации Ронколейкин + Ингарон в эксперименте, а также о целесообразности ее использования в лечении онкологических больных. Дальнейший поиск может выявить и другие эффективные сочетания иммунопрепаратов, что позволит оптимизировать цитокинотерапию и уточнить ее роль и место в комплексном лечении злокачественных опухолей, в том числе в комбинации с химиотерапией.

РЕДАКТИРОВАНИЕ ГЕНОМА В ЛИМФОИДНЫХ КЛЕТКАХ ЧЕЛОВЕКА: ВОЗМОЖНОСТИ И ОГРАНИЧЕНИЯ

Зотова А.^{1,3}, Лопатухина Е.^{1,3}, Мазуров Д.^{1,2,3}

¹ Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

² ГНЦ «Институт иммунологии» ФМБА России, Москва, Россия

³ Институт биологии гена РАН, Москва, Россия

Программируемые эндонуклеазы вносят разрыв в определенном участке ДНК, который подвергается репарации в клетках по механизму негомологичного со-

единения концов (NHEJ), что, как правило, приводит к нокаутированию гена, или по механизму гомологичной рекомбинации (HDR), если присутствует ДНК-донор, который точно замещает участок поврежденного генома (knock-in). Редактирование генома лимфоидных клеток человека представляет собой сложную задачу из-за низкой трансфекционной способности этих клеток. Дополнительные трудности вносит неэффективная репарация ДНК-разрывов путем HDR. Тем не менее, интерес к редактированию генома лимфоидных клеток не угасает, что связано, прежде всего, с необходимостью лечения различных наследственных иммунодефицитов и ВИЧ-инфекции.

Перед нами стояла задача оценить эффективность и динамику получения нокаута и нокина в линиях Т- и В-клеток человека посредством изменения матрицы для репарации ДНК, локусов ДНК-мишеней и типов геномных нуклеаз. Используя нуклеазу, содержащую домены «цинковых пальцев» (ZFN), мы сконструировали клеточные линии Jurkat и СЕМ с геном вируса иммунодефицита человека 1 типа (ВИЧ-1), интегрированным в локус AAVS1. При дополнительной трансфекции вспомогательными векторами такие клетки стабильно производят вирусные частицы. Также было показано, что применение как ZFN, так и CRISPR/Cas9 технологии в равной степени эффективно для получения нокаутов в лимфоидных клетках. Однако нами было отмечено значительное снижение on-target активности высокоточной нуклеазы eCas9 1.1, работающей как никаза. Таким образом, для изучения функциональной роли генов в лимфоидных клетках необходимо учитывать баланс между эффективностью нуклеазы в отношении целевого гена и ее off-target (побочной) активностью.

Работа была выполнена при поддержке гранта РФ «Поиск новых факторов рестрикции ВИЧ-1, ограничивающих репликацию вируса в условиях его межклеточной трансмиссии, путем скрининга библиотеки нокаутов GeCKO» 15-15-00135.

ОЦЕНКА УРОВНЕЙ ЦИТОКИНОПОДОБНЫХ ВЕЩЕСТВ В СУПЕРНАТАНТАХ КУЛЬТУР БАКТЕРИЙ

Зурочка А.В.^{1,2}, Зурочка А.В.^{1,2}, Дукардт В.В.¹, Зуева Е.Б.¹, Добрынина М.А.¹, Тяпаева Я.В.³, Гриценко В.А.^{3,4}

¹ ФГБУН «Институт иммунологии и физиологии» УрО РАН, Екатеринбург, Россия

² ФГАОУ ВО «Южно-Уральский государственный университет» (Национальный исследовательский университет), Челябинск, Россия

³ ФГБУН «Институт клеточного и внутриклеточного симбиоза» УрО РАН, Оренбург, Россия

⁴ ФГБУН «Оренбургский научный центр» УрО РАН, Оренбург, Россия

Введение. Инфицирование тканей макроорганизма бактериальными агентами сопровождается развитием воспалительной реакции, в регуляции которой участвуют различные цитокины, вырабатываемые клетками иммунной системы. В то же время в опытах *in vitro* нами было показано, что бактерии и супернатанты их бульонных культур при контакте с нейтрофилами существенно влияют на продукцию фагоцитами цитокинов, причем направленность (стимулирование/ингибирование) и выраженность этих эффектов зависели от видовой принадлежности микроорганизмов

(Зурочка А.В. и соавт., 2016). Учитывая выявленное разнообразие модифицирующего действия бактерий и их супернатантов на нейтрофилы, мы предположили, что подобное влияние может быть связано с синтезом самими микроорганизмами ряда цитокинов (цитокиноподобных веществ – ЦПВ). Цель работы – проверка данного предположения.

Материалы и методы. В опытах использовали 65 клинических изолятов *Staphylococcus aureus* (n = 23), коагулазоотрицательных стафилококков (КОС) – *S. haemolyticus* и *S. epidermidis* (n = 14), *Enterococcus faecalis* и *E. faecalis* (n = 8), *Pseudomonas aeruginosa* (n = 8), энтеробактерий – *Klebsiella pneumoniae* и *Escherichia coli* (n = 12), выделенный из ран у больных с синдромом диабетической стопы, из влагалища у женщин с миомой матки, из пупсул у новорожденных с пиодермией. Бактерии выращивали в мясоептонном бульоне (МПБ) в течение 24 ч, после чего культуры центрифугировали при 3000 об/мин в течение 30 мин и отбирали надосадочную жидкость (супернатант).

Наличие в супернатантах бактерий цитокинов (ЦПВ) определяли на приборе MAGPIX-100 (США) с использованием тест-системы Multiplex (Luminex, США) для определения 15 цитокинов (G-CSF, GM-CSF, IFN γ , IL-10, IL-12p70, IL-13, IL-17A, IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, MCP-1, MIP-1 β , TGF- α); контролем служил МПБ без бактерий. Опыты проводили в двух повторностях; результаты измерений округляли до 0,1 пкг/мл; при регистрации в супернатантах цитокинов в концентрации меньше 3 пкг/мл считали, что в образце ЦПВ отсутствуют. Данные обработаны методами вариационной статистики.

Результаты. Установлено, что в супернатантах бульонных культур бактерий обнаруживаются те или иные ЦПВ, наличие и концентрация которых зависели от видовой/родовой принадлежности микроорганизмов. Наиболее активными продуцентами ЦПВ оказались штаммы *S. aureus*, в супернатантах которых присутствовали 13 из 15 тестируемых цитокинов (все, кроме IL-5 и TGF- α); бактерии остальных таксонов в порядке убывания числа продуцируемых ЦПВ распределились в ряд: КОС (7 цитокинов – G-CSF, GM-CSF, IFN γ , IL-12p70, IL-17A, IL-1 β , MIP-1 β), энтерококки (4 – G-CSF, IFN γ , IL-12p70, IL-17A), энтеробактерии и псевдомонады (1 – G-CSF). В то же время наблюдалось внутривидовое разнообразие бактерий по наличию и концентрации в супернатантах ЦПВ – доля штаммов-продуцентов с учетом их вида и типа ЦПВ колебалась в диапазоне 4,3–83,3%, а уровни варьировали от 3,3 до 239,6 пкг/мл. При этом максимальные (штабмовые и средние) значения концентраций ЦПВ регистрировались у изолятов *S. aureus* и *S. haemolyticus*. Следует отметить, что 5 цитокинов (G-CSF, GM-CSF, IFN γ , IL-12p70, IL-17A) тестировались в супернатантах у ряда изолятов *S. aureus*, *S. haemolyticus* и *E. faecalis* в относительно высоких концентрациях (> 20 пкг/мл), другие ЦПВ в изученных образцах либо не обнаруживались, либо их уровень был ниже указанного порога.

Заключение. У изученных грамположительных и грамотрицательных бактерий в супернатантах бульонных культур выявляется ряд цитокинов (цитокиноподобных веществ – ЦПВ), причем их продукция (наличие и уровень) зависит от таксономической принадлежности микроорганизмов и характеризуется внутривидовой вариабельностью. Наиболее активными продуцентами

ЦПВ являются стафилококки (*S. aureus* и КОС, в частности *S. haemolyticus*), которые способны синтезировать 7–13 цитокинов, причем 5 из них (G-CSF, GM-CSF, IFN γ , IL-12p70, IL-17A) в относительно высоких концентрациях (> 20 пкг/мл). Учитывая принадлежность указанных цитокинов к провоспалительным и ростовым факторам, нельзя исключить их причастность к развитию начальных этапов воспалительной реакции при инфицировании тканей макроорганизма цитокин-продуцирующими бактериями, в частности путем ранней активации иммунокомпетентных клеток, что требует дальнейшего изучения данного феномена. С другой стороны, необходимо выяснить структурно-молекулярное сходство/различие ЦПВ бактерий с цитокинами макроорганизма, определить их генетическое детерминирование, эволюционное происхождение и роль в биологии прокариотов, а также их участие в формировании патогенного потенциала микроорганизмов.

ВЛИЯНИЕ СИНТЕТИЧЕСКОГО ПЕПТИДА АКТИВНОГО ЦЕНТРА GM-CSF НА ПРОДУКЦИЮ БАКТЕРИЯМИ ЦИТОКИНОПОДОБНЫХ ВЕЩЕСТВ В БУЛЬОННЫХ КУЛЬТУРАХ

Зурочка В.А.^{1,2}, Зурочка А.В.^{1,2}, Дукардт В.В.¹, Зуева Е.Б.¹, Добрынина М.А.¹, Тяпаева Я.В.³, Гриценко В.А.^{3,4}

¹ ФГБУН «Институт иммунологии и физиологии» УрО РАН, Екатеринбург, Россия

² ФГАОУ ВО «Южно-Уральский государственный университет» (Национальный исследовательский университет), Челябинск, Россия

³ ФГБУН «Институт клеточного и внутриклеточного симбиоза» УрО РАН, Оренбург, Россия

⁴ ФГБУН «Оренбургский научный центр» УрО РАН, Оренбург, Россия

Введение. В очаге воспаления бактериальные агенты неминуемо вступают во взаимодействие с различными регуляторными молекулами макроорганизма, в том числе цитокинами, которые могут не однозначно влиять на их жизнеспособность и биологические свойства. Так, нами экспериментально показано, что синтетический пептид активного центра GM-CSF оказывал ингибирующее действие на репродуктивный потенциал некоторых бактерий (в частности стафилококков) и их биопленкообразование (Зурочка А.В. и соавт., 2015; Гриценко В.А. и соавт., 2015). В то же время в предварительных опытах нами выявлена способность клинических изолятов *Staphylococcus aureus* и ряда других бактерий экскретировать в культуральную среду цитокиноподобные вещества (ЦПВ), с наличием которых, возможно, связано разнонаправленное модифицирующее действие бактерий и их супернатантов на продукцию нейтрофилами широкого спектра цитокинов (Зурочка А.В. и соавт., 2016). Это послужило основанием для изучения влияния синтетического пептида активного центра GM-CSF на продукцию бактериями ЦПВ.

Материалы и методы. В опытах использовали 28 клинических изолятов *S. aureus* (n = 14), *Enterococcus faecalis* и *E. faecalis* (n = 8), энтеробактерий – *Klebsiella pneumoniae* и *Escherichia coli* (n = 6), выделенных из ран у больных с синдромом диабетической стопы, из влагалища у женщин с миомой матки, из пупсул у новорожденных с пио-

дермией. Бактерии выращивали в течение 24 часов в мясопептонном бульоне (МПБ) с синтетическим пептидом активного центра GM-CSF (в конечной концентрации 10 мкг/мл) и без него, после чего культуры центрифугировали при 3000 об/мин в течение 30 минут и отбирали надосадочную жидкость (супернатант).

Наличие в супернатантах бактерий цитокинов (ЦПВ) и их уровень определяли на приборе MAGPIX-100 (USA) с использованием тест-системы мультиплексного анализа (Multiplex) компании Luminex (USA) для определения 15 цитокинов (G-CSF, GM-CSF, IFN γ , IL-10, IL-12p70, IL-13, IL-17A, IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, MCP-1, MIP-1 β , TGF- α); контролем служил МПБ без бактерий. Опыты проводили в двух повторностях; результаты измерений округляли до 0,1 пкг/мл; при регистрации в супернатанте цитокинов в концентрации меньше 3 пкг/мл считали, что в образце ЦПВ отсутствуют. Данные обработаны методами вариационной статистики. О достоверности отличий между опытными и контрольными группами судили по критерию Стьюдента – t ($p < 0,05$).

Результаты. Добавление в МПБ синтетического пептида активного центра GM-CSF по-разному влияло на продукцию ЦПВ бактериями в зависимости от их видовой/родовой принадлежности. Так, при наличии в среде данного пептида у всех культур энтерококков регистрировалось снижение в супернатантах уровня продуцируемых ими ЦПВ (G-CSF, IFN γ , IL-12p70, IL-17A) на 58,5-98,3%, тогда как у энтеробактерий (*K. pneumoniae* и *E. coli*) уменьшение концентрации G-CSF наблюдалось только у 33,3% культур, а у остальных изолятов фиксировалось повышение уровня указанного ЦПВ в 2,2-2,5 раза. Среди изолятов *S. aureus* реакция на синтетический пептид GM-CSF была еще более вариабельной и касалась всех продуцируемых ими ЦПВ (G-CSF, GM-CSF, IFN γ , IL-10, IL-12p70, IL-13, IL-17A, IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-6, MCP-1, MIP-1 β). С учетом изменения под действием пептида концентрации ЦПВ в супернатантах культур *S. aureus* выделено 3 группы изолятов: 1 – 7,1-42,9% штаммов, у которых наблюдалось снижение продукции указанных ЦПВ (в среднем на 15,0-65,8%); 2 – 7,1-57,1% штаммов, у которых уровень ЦПВ существенно не изменялся ($\pm 10\%$ от контроля – индифферентность); 3 – 35,7-64,3% штаммов, у которых фиксировалось повышение концентрации ЦПВ (в 1,4-3,6 раза; $p < 0,05$). Эта же закономерность касалась и тех ЦПВ (G-CSF, IFN γ , IL-12p70, IL-17A), которые секретиrowались *S. aureus* в контроле на относительно высоком уровне (> 20 пкг/мл) – их продукция под действием синтетического пептида GM-CSF у одних изолятов бактерий стимулировалась в 1,4-2,3 раза, у других – ингибировалась на 15,0-32,6%.

Заключение. Анализ полученных данных свидетельствует, что присутствие в питательной среде синтетического пептида активного центра GM-CSF отражается на способности грампозитивных и грамотрицательных бактерий продуцировать цитокиноподобные вещества (ЦПВ), а направленность и выраженность этой реакции на пептид характеризуются не только видовой/родовой детерминированностью, но и штаммовой вариабельностью. Следует отметить, что большинство изолятов *S. aureus*, у которых под влиянием пептида наблюдалась стимуляция выработки ЦПВ, были выделены из ран у больных с синдромом диабетической стопы. Изучение механизмов продукции бактериями ЦПВ и её регуляции синтетическим пептидом активного центра GM-CSF должно стать предметом дальнейших исследований.

ЗАВИСИМОСТЬ ДИФФЕРЕНЦИРОВКИ МАКРОФАГОВ ОТ СТРУКТУРЫ ИМПЛАНТИРУЕМОГО МАТЕРИАЛА

Калмыкова Н.В., Демьяненко И.А., Хац Ю.С., Суслов А.П.

ФГБУ «Федеральный научно-исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии им. почетного академика Н.Ф. Гамалеи» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

При контакте макрофагов с имплантируемым материалом происходит их активация и последующая поляризация на два подтипа – классически активированных M1 и альтернативно активированных M2. Так как одной из основных проблем регенеративной медицины и трансплантологии является ответ организма хозяина на введенный материал, то поляризация макрофагов крайне важна, так как именно соотношение подтипов M1/M2 в зоне введения определяет выраженность воспаления, деградацию материала и скорость регенерации ткани. В литературе имеется множество данных о связи поляризации иммуногенеза с физическими и механическими свойствами имплантируемого, но мало известно о зависимости поляризации от морфологической структуры. В настоящей работе было изучено влияние структуры имплантируемого материала на вызываемый им макрофагальный ответ, а именно на соотношение M1 и M2 подтипов макрофагов.

Цель. Исследовать дифференцировку макрофагов на подтипы M1 и M2 при имплантации разных структурных форм биоматериала на основе очищенного внеклеточного матрикса (ВКМ), полученного методом щелочной обработки дермы быка домашнего.

Для анализа тканевой реакции мышам ($n = 48$) делали подкожные инъекции исследуемых образцов в область спины. Животным опытной группы вводили биоматериал на основе очищенного ВКМ в форме геля и в форме порошка с жидким компонентом глюкозой для удобства введения. Гель представляет собой солиubilizированный матрикс, а порошок – измельченный матрикс с сохраненной структурой пучков волокон и волокон с размером частиц не более 500 мкм. Животным контрольной группы вводили аналогичный объем 10% раствора глюкозы. На 1-е и 5-е сутки после инъекций мышам выводили из эксперимента и проводили иссечение участков кожного лоскута, содержащих имплантированный образец. На срезах кожного лоскута проводили иммуногистохимическое выявление специфического макрофагального антигена f4/80, а также антигенов, характерных для различных подтипов макрофагов: для M1 – CCR7, для M2 – CD163, при этом характеризовали соединительную ткань, располагающуюся между *panniculus carnosus* и имплантатом и дерму. Исследовали по 20 полей зрения для каждого животного.

Результаты исследования показали, что количество M1 макрофагов в соединительной ткани зоны имплантации порошка ВКМ статистически достоверно больше, как на 1-е, так и на 5-е сутки после введения, по сравнению с контрольной группой. Также было обнаружено увеличение числа M2 макрофагов на 5-е сут в дерме прилегающей кожи в той же группе. Кроме того, было выявлено статистически достоверное увеличение соотношения M1/M2 на 1-е сутки в соединительной ткани, окружающей порошок ВКМ. Количество макрофагов в группе имплантации геля статистически не отличалось от контроля на обоих исследованных сроках.

Полученные данные свидетельствуют об интенсификации макрофагальной реакции в коже при субдермальном введении ВКМ в форме порошка.

ПЕРСПЕКТИВЫ РЕКОМБИНАНТНЫХ ПРЕПАРАТОВ ДЛЯ ИММУНОПРОФИЛАКТИКИ ИНФЕКЦИЙ, ВЫЗЫВАЕМЫХ *PSEUDOMONAS AERUGINOSA*

Калошин А.А., Солдатенкова А.В., Зимина Е.М., Михайлова Н.А.

ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова», Москва, Россия

Одним из наиболее серьезных возбудителей оппортунистических инфекций является синегнойная палочка (*Pseudomonas aeruginosa*). Этот микроорганизм характеризуется высокой способностью к быстрому развитию резистентности к антибиотикам, что делает неэффективными общепринятые методы лечения. Поэтому актуальным является разработка иммунобиологических препаратов для борьбы с синегнойными инфекциями. Создание вакцин на основе протективных антигенов возбудителя пока не увенчалось положительными результатами из-за технологических трудностей выделения целевых антигенов, что преодолимо с использованием генно-инженерных методов.

Ранее показано, что рекомбинантный белок F наружной мембраны (OrgF) *P. aeruginosa* и делеционная форма экзотоксина А (анатоксин) *P. aeruginosa* способствовали защите иммунизированных мышей от экспериментальной внутрибрюшинной синегнойной инфекции. При этом комплексное введение обоих белков приводило к увеличению защитных свойств. Поэтому представляло интерес получение слитного рекомбинантного белка, включающего аминокислотные последовательности OrgF и анатоксина. С этой целью ген, кодирующий белок OrgF, встраивали в рекомбинантную конструкцию на базе плазмиды pET28b⁺, несущей ген анатоксина. В результате экспрессии в клетках *E. coli* штамма BL21(DE3) созданной конструкции был синтезирован слитый рекомбинантный белок OrgF-анатоксин, который хроматографически очищали на никель-активированном сорбенте. В иммуноблоттинге этот белок специфично реагировал с иммунными сыворотками к отдельным рекомбинантным белкам (OrgF и анатоксину). Далее с целью увеличения спектра антигенных детерминант в плазмидную конструкцию был встроены еще одного мембранного белка *P. aeruginosa* (OrgI). В результате получен слитый рекомбинантный белок OrgF-анатоксин-OrgI с молекулярной массой 107,2 кДа, специфично реагирующий в иммуноблоттинге с сыворотками к рекомбинантным белкам OrgF, OrgI и анатоксину. Содержание целевого рекомбинантного продукта в очищенном препарате, составляло 96,4%, что подтверждено капиллярным электрофорезом.

Оценку защитных свойств полученных слитых рекомбинантных белков проводили при двукратном, с двухнедельным интервалом, внутрибрюшинном введении мышам в дозах 50 и 100 мкг на животное. В качестве препарата сравнения использовали комплекс из отдельных рекомбинантных белков: OrgF и анатоксина.

Через две недели после курса иммунизации мышей заражали живой вирулентной культурой *P. aeruginosa* штамма PA103 и далее в течение недели проводили подсчет погибших особей. Для животных, иммунизированных слитым белком OrgF-анатоксин в дозе 50 мкг, ЛД₅₀ составила 40,61 млн м.к. (млн микробных клеток), а в дозе 100 мкг –

32,99 млн м.к. В группах животных, иммунизированных слитым белком OrgF-анатоксин-OrgI в дозе 50 мкг, ЛД₅₀ составила 53,59 млн м.к., а в дозе 100 мкг – 35,36 млн м.к. Для мышей, иммунизированных комплексом двух рекомбинантных белков, значение ЛД₅₀ соответствовало 46,65 млн м.к., а для контрольных животных ЛД₅₀ соответствовала 15,39 млн м.к.

Таким образом, полученные результаты открывают перспективы для создания иммунобиологических препаратов на основе рекомбинантных белков. В дальнейшем для выбора наиболее эффективной вакцины целесообразно более глубокое изучение влияния рекомбинантных препаратов на индукцию специфического иммунного ответа.

КРАТКОСРОЧНОЕ КУЛЬТИВИРОВАНИЕ МОНОНУКЛЕАРНЫХ ЛЕЙКОЦИТОВ С РЕЛЬЕФНЫМ КАЛЬЦИЙ-ФОСФАТНЫМ ВЛИЯНИЕМ ОПСОНИЗАЦИИ НА ФАГОЦИТОЗ МИКРОБАКТЕРИЙ МАКРОФАГАМИ У МЫШЕЙ С РАЗНОЙ ГЕНЕТИЧЕСКОЙ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬЮ К ТУБЕРКУЛЕЗУ

Капина М.А., Рубакова Э.И., Логунова Н.Н., Майоров К.Б., Апт А.С.

ФГБНУ «Центральный научно-исследовательский институт туберкулеза», Москва, Россия

Опсонизация – это биологический процесс прикрепления опсонов, которыми являются белки плазмы крови или их фрагменты, к поверхности бактерий или вирусов, что обуславливает более легкое распознавание и захват их фагоцитами. К опсоинам, в частности, относятся молекулы антител (преимущественно, IgG и IgM), фрагменты компонентов комплемента, С-реактивный белок. Важность опсонизации при фагоцитозе микобактерий была показана в работах с антителами к арабиноманнану: инкубация микобактерий с антителами перед заражением животных снижала тяжесть течения инфекции (Hamasur V. et.al., 2004).

В нашей работе мы исследовали влияния опсонов крови мышей генетически чувствительных и резистентных к туберкулезу (ТБ) линий на способность макрофагов фагоцитировать *M. tuberculosis* H37Rv. При отработке методов сыворотку крови здоровых и зараженных микобактериями H37Rv мышей резистентной линии В6 в разных процентных соотношениях (от 20 до 1,25 %) добавляли к микобактериям и инкубировали в течение 30 минут при 4 °С. После инкубации микобактерии добавляли к культуре выделенных из брюшной полости макрофагов в соотношении 1:5 (одна бактерия на 5 макрофагов) и оценивали фагоцитарную активность под микроскопом по окраске аурамино микобактерий, захваченных макрофагами. Результат оценивали по подсчету фагоцитарного числа (процент инфицированных клеток) и фагоцитарного индекса (среднее число микобактерий на инфицированный макрофаг). Наивысшие значения были получены при содержании сыворотки 1,5 – 5%, как от здоровых, так и от инфицированных мышей. В последующих экспериментах для опсонизации использовали 3-процентное содержание сыворотки. Помимо этого, мы оценили влияние опсонизации на жизнеспособность фагоцитированных бактерий по включению радиоактивного урацила микобактериями. При опсонизации 3-процентной сывороткой включение урацила было самым низким, что подтверждает благоприятное значение опсонизации для

организма-хозяина: после предварительного контакта с факторами плазмы крови внутриклеточные микобактерии размножаются хуже. После обработки микобактерий сывороткой, полученной от зараженных ранее мышей, рост микобактерий в макрофагах снижался в 3,5 раза по сравнению с микобактериями, обработанными не иммунной сывороткой, скорее всего, из-за присутствия в иммунной сыворотке специфических к микобактериям антител.

В последующих экспериментах мы сравнили активность сывороток, полученных от мышей В6 и от выведенных в нашей лаборатории рекомбинантных конгенных линий мышей В6.1-9.3, В6.1-139 и В6.1-100, отличающихся по коротким фрагментам комплекса H2, которые были перенесены от чувствительной к ТБ линии I/St на генетическую резистентных мышей В6, в результате чего эти линии приобрели разную чувствительностью к ТБ (Logunova et al., 2015). Результаты показали, что при опсонизации микобактерий сывороткой более высокий фагоцитарный индекс давали сыворотки резистентных линий В6.1-139 (1, 68) и В6.1-9.3 (1,31) по сравнению с сывороткой чувствительной линией В6.1-100 (0,55). По фагоцитарному числу достоверных различий не наблюдалось.

Возможно, еще один из механизмов, определяющих восприимчивость мышей к туберкулезу — это эффективность опсонизации микобактерий, которая влияет на эффективность фагоцитоза.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ 15-15-30020 (клеточные культуры) и гранта РФФИ 15-04-02002 (выведение и поддержание конгенных линий мышей).

ОСОБЕННОСТИ ВЛИЯНИЯ ЭЛЕКТРОМАГНИТНОГО ИЗЛУЧЕНИЯ МОБИЛЬНОГО ТЕЛЕФОНА НА АКТИВАЦИЮ ЛИМФОЦИТОВ ДОНОРОВ, НАХОДЯЩИХСЯ В ПОСТВАКЦИНАЛЬНОМ ПЕРИОДЕ

Капустин И.В.¹, Тульская Е.А.^{1,2}, Бляхер М.С.¹, Лопатина Т.К.¹, Котелева С.И., Нестеренко В.Г.³, Суслов А.П.³, Коноплева М.В.³

¹ ФБУН «Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского» Роспотребнадзора, Москва, Россия

² ФГБУ «Научно-исследовательский институт экологии человека и гигиены окружающей среды им. А.Н. Сысина» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

³ ФГБУ «Федеральный научно-исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф. Гамалеи» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

Введение. Вопрос о влиянии электромагнитного излучения (ЭМИ) мобильных телефонов на разные функции организма привлекает внимание исследователей, работающих в разных областях науки — генетиков, онкологов, гериатров, иммунологов. Изучение этих вопросов проводится с использованием разных методических подходов в опытах *in vitro* или *in vivo*, с использованием в качестве источника ЭМИ либо разных моделей мобильных телефонов, либо имитирующих их искусственно созданных систем.

Цель. Сравнение чувствительности клеток периферической крови людей до и после вакцинации к воздействию ЭМИ мобильного телефона.

Материалы и методы. Объектом исследования служила цельная венозная кровь и выделенные из нее лимфоциты 21 взрослого донора (от 20 до 55 лет): 10 — это здоровые доноры и 11 человек, через 7 дней после вакцинации их менингококковой, полисахаридной (серогрупп А, С, Y и W-135), конъюгированной с дифтерийным анатоксином вакциной. Исследование влияния ЭМИ телефона на функциональную активность лимфоцитов периферической крови проводили следующим образом — лимфоциты или клетки цельной крови помещали в лунки культуральных планшетов, на планшеты воздействовали мобильным телефоном, принимавшем звонки на протяжении 5 часов, далее среди лимфоцитов определяли % CD69⁺ лимфоцитов, а в надосадках — концентрацию IFN γ , TNF α , IL-6 и IL-8. По разнице этих величин в культуре клеток до и после воздействия ЭМИ телефона судили о наличии или отсутствии его воздействия на эти показатели.

Результаты. Состояние иммунной системы людей из группы здоровых доноров и доноров, которые в дальнейшем подверглись вакцинации, практически не отличалось и все показатели находились в пределах возрастной нормы. Через неделю после вакцинации наблюдались значимые отличия практически по всем основным субпопуляциям, которые выражались в повышении абсолютного количества лейкоцитов и лимфоцитов. Кроме того, процент активированных цитолитических Т-клеток (CD3⁺CD8⁺), несущих разные активационные маркеры, через неделю после прививки имел тенденцию к снижению: % CD69 с 4,9 \pm 2,9 до 2,2 \pm 1,0; % HLA-DR с 4,1 \pm 1,5 до 2,5 \pm 0,8. Таким образом, в эксперименте были использованы клетки крови практически здоровых доноров и доноров, иммунная система которых была изменена под влиянием вакцины, т.е. в большей степени синхронизирована.

В результате исследования воздействия ЭМИ мобильного телефона на клетки крови выявлено, что изменение процента лимфоцитов, несущих ранний маркер активации CD69, наблюдали существенно чаще и с большей интенсивностью в группе доноров, находившимися в поствакцинальном периоде по сравнению со здоровыми донорами. Под воздействием ЭМИ телефона средние значения продукции изученных цитокинов не изменялись в образцах супернатантов в обеих группах, но у здоровых доноров были в 1,5 — 2 раза выше, чем у людей в поствакцинальном периоде. Продукция всех цитокинов клетками крови существенно чаще и с большей интенсивностью изменялась под влиянием ЭМИ телефона в группе здоровых доноров по сравнению с донорами, находившимися в поствакцинальном периоде. Продукция IFN γ клетками крови изменилась у 3 здоровых доноров (в среднем в 3,5 раза, а у одного человека — в 6,5 раз) и у 2 вакцинированных (в среднем в 1,4 раза, такого сильного изменения, как у здоровых доноров не было), т.е. интенсивность этих изменений была принципиально разной; продукция TNF α клетками крови изменилась у 5 здоровых доноров (в среднем в 1,9 раз, а у отдельных людей до 3,5 раз) и у 2 вакцинированных (в 1,4 раза), т.е. и в данном случае интенсивность этих изменений была IFN γ разной; продукция IL-6 клетками крови изменилась у 5 здоровых доноров (в среднем в 2 раза, а у отдельных индивидуумов — в 4 раза) то время, как этот показатель изменился под влиянием ЭМИ телефона только у одного вакцинированного (в 2,5 раза); продукция IL-8 клетками крови изменилась

у 7 здоровых доноров (в среднем в 3 раза, а у отдельных индивидуумов – в 5 раз) и у 4 вакцинированных (в среднем в 2,5 раза, но не более, чем в три раза).

Заключение. Основной вывод по результатам данного исследования заключается в том, что изменение продукции цитокинов клетками крови под воздействием ЭМИ телефона происходит индивидуально; это следует учитывать при решении вопроса о наличии или отсутствии влияния ЭМИ телефона на состояние лимфоцитов.

ОЦЕНКА ЛАБОРАТОРНЫХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ КЛИНИЧЕСКИ ЗДОРОВЫХ ОБЕЗЬЯН ВИДА МАКАК- РЕЗУС (*MACACA MULATTA*) АДЛЕРСКОГО ПИТОМНИКА

Карал-оглы Д.Д., Игнатова И.Е.,
Мухаметзянова Е.И., Гварамия И.А., Агрба В.З.

ФГБНУ «Научно-исследовательский институт
медицинской приматологии», Сочи, Россия

Введение. Широко известно, что филогенетическое родство представителей отряда приматов делает обезьян адекватной моделью для воспроизведения на них различных патологических состояний человека. Данные, полученные на обезьянах, с минимальной коррекцией можно экстраполировать на людей, для чего необходимы точные сведения о функционировании их физиологических систем в норме.

Цель. Изучение в комплексе кроветворной и иммунной систем макаков-резусов Адлерского питомника, животных, наиболее востребованных в экспериментальной медицине. Все исследования на животных проводили в соответствии с требованиями комитета по биоэтике и федеральным законом РФ о защите животных от жестокого обращения (ст.4 Закона РФ о защите животных от жестокого обращения от 01 декабря 1999 г.).

Материалы и методы. Материалом для исследования служила цельная кровь, взятая в гепарин, а также сыворотка крови 30 макаков-резусов обоего пола в возрасте от 3 до 5 лет. В эксперименте были использованы следующие методы:

1. Метод проточной цитометрии на проточном цитометре Beckman Coulter EpicsXL-MCL (Beckton Coulter, США) с аргоновым лазером с длиной волны 488 нм. Для постановки реакции использовали моноклональные антитела (фирма «Becton Dickinson»), специфичные для антигенов обезьян, в следующих комбинациях: CD3 – FITC/CD4-PE, CD3 – FITC/CD8-PE, CD3 – FITC/CD16-PE, CD3 – FITC/CD20-PE, CD3 – FITC/CD25-PE, CD3 – FITC/CD45RA, CD3 – FITC/HLA-DR. Цитограммы исследуемой клеточной взвеси выводили на основе регистрируемых параметров малоуглового (FSC) и бокового (SSC) светорассеяния.

2. Гематологический анализ крови обезьян проводили на гематологическом анализаторе фирмы «Beckman 5 diff», USA.

3. Исследование функциональной активности лимфоцитов обезьян (IFN α , IFN γ , спонтанная продукция и циркулирующий в сыворотке IFN) изучали биологическим методом в нашей модификации путем определения способности лимфоцитов обезьян отвечать интерфероновой реакцией на адекватное воздействие.

4. Определение провоспалительных цитокинов (IL-1 β , IL-6, TNF α) и С-реактивного белка проводили методом ИФА на приборе «УНИПЛАН» с использованием наборов ЗАО «Вектор-Бест».

Результаты. Показатели клеточного звена иммунитета клинически здоровых обезьян варьировали в широких пределах, отмечалось, что экспрессия CD3, CD4 и CD45RA у самцов незначительно выше, а экспрессия CD8 ниже, чем у самок. Данные, полученные на макаках-резусах как для самцов, так и для самок, максимально приближены к границам нормы таковых у людей, за исключением CD20, показатели которого колеблются от 12,75 \pm 8,25% у самцов и 13,45 \pm 9,55% у самок.

Поскольку результаты гематологического исследования позволяют выявить различные патологии и заболевания, представляло интерес оценить гематологические показатели клинически здоровых макаков-резусов Адлерского питомника. Исследование показало, что результаты гематологического анализа существенно не отличаются от таковых, установленных для людей и соответствуют данным, описанным ранее, за исключением повышенного содержания лейкоцитов – 14,6 \pm 6,5 $\times 10^9$ /л и низкой СОЭ-1-3 мм/ч по сравнению с человеком, что является характерным для приматов и объясняется лабильностью их физиологических показателей.

Исследование показателей интерферонового статуса выявило вариабельность в продукции некоторых интерферонов между самцами и самками обезьян, однако эти значения не выходили за рамки нормативных величин, установленных для людей (IFN α – 160 \pm 32 Ед/мл, IFN γ – 48 \pm 16 Ед/мл, IFN-сп – 4 \pm 2 Ед/мл, IFN-S – 4 \pm 2 Ед/мл) и соответствует ранее установленным для макаков-резусов.

В настоящее время определение цитокинов достаточно широко используется в клинической практике, поскольку их количественное определение и соотношения между собой, как правило, отражают динамику патологического процесса, коррелируют с активностью заболевания и позволяют судить об эффективности проводимого лечения. Однако при этом необходимо четко знать «референтные» уровни цитокинов, свойственные здоровым животным. Полученные результаты показали, что содержание провоспалительных цитокинов в сыворотке крови клинически здоровых половозрелых макаков-резусов обоего пола максимально приближено к нормам, установленным для людей. Колебания значений С-реактивного белка от 0,4 до 9,6 мг/мл объясняется вариабельностью многих показателей у обезьян.

Таким образом, в результате проведенных исследований были установлены гематологические показатели, изучены клеточное звено иммунитета, интерфероновый статус, определены провоспалительные цитокины и С-реактивный белок у клинически здоровых макаков-резусов Адлерского питомника. Показано, что исследованные показатели макаков-резусов максимально приближены к аналогичным у людей, что еще раз подтверждает возможность использования обезьян этого вида как адекватной модели для воспроизведения и изучения различных патологических состояний человека, а также доклинических испытаний новых фармакологических препаратов.

АНТИИДИОТИПИЧЕСКАЯ ВАКЦИНАЦИЯ ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ АУТОИММУННОМ ЭНЦЕФАЛОМИЕЛИТЕ

Кащенко Э.А., Белгородцев С.Н., Селедцова Г.В.

Научно-исследовательский институт
Фундаментальной и клинической иммунологии,
Новосибирск, Россия

Введение. Ключевую роль в патогенезе рассеянного склероза (РС) играют Т-лимфоциты, реактивные по отношению к поверхностным антигенам клеток нервной ткани. Показано, что адаптивный перенос активированных миелин-реактивных Т-клеток приводит к развитию экспериментального аутоиммунного энцефаломиелита (ЭАЭ) у животных. Аутореактивные CD4⁺Т-клетки продуцируют провоспалительные цитокины (IL-2, TNF α , IFN γ), которые поддерживают в ЦНС миелин-деструктивный воспалительный процесс. Является очевидным то, что элиминация аутоиммунных Т-лимфоцитов из организма должна лежать в основе патогенетического лечения рассеянного склероза (РС). Один из способов решения этой задачи связан с возможностью стимуляции антиидиотипического иммунного ответа, направленного на идиотипы рецепторов аутореактивных лимфоцитов. Вакцинация миелин-реактивными Т-клетками животных с экспериментальным аутоиммунным энцефаломиелитом приводит к остановке развития аутоиммунного демиелинизирующего процесса. Т-клеточная делеция является следствием литической активности антиклональных CD8⁺Т-клеток, которые специфически распознают идиотипические структуры Т-клеточных рецепторов. Т-клеточная вакцинация также вызывает генерацию анти-клональных CD4⁺Т-клеток, которые в активированном состоянии продуцируют противовоспалительные цитокины IL-4 и IL-10.

Цель. Разработать Т-клеточную вакцину на основе аутореактивных эффекторных Т-лимфоцитов в экспериментальной модели аутоиммунного энцефаломиелита, и оценить ее субпопуляционный состав.

Материалы и методы. Эксперименты проводили на взрослых (4-5 месяцев) апатогенных мышах линии C57BL/6 (B6, H-2^b). Мышей иммунизировали подкожно смесью корпускулярного антигена головного мозга свиньи с основным белком миелина в адьюванте Фрейнда в дозе 100 мкг на мышь, на 0, 21 и 28 дни. Оценка неврологического дефицита проводилась по бальному индексу ЭАЭ. На 35 день у животных производили забор селезенки. Для приготовления антиидиотипической вакцины спленоциты культивировали с основным белком миелина в дозе 100 мкг/мл в течение недели. Затем спленоциты облучали и использовали в качестве антиидиотипической вакцины. Для оценки поверхностных маркеров пробы подвергали исследованию в проточном цитофлуориметре фирмы, Becton Dickinson (США) с определением относительного содержания лимфоцитов, экспрессирующих соответствующий CD-маркер, среди 10000 просчитанных клеток. Специфичность пролиферативного ответа полученной культуры спленоцитов в отношении белков миелина подтверждали в пролиферативном тесте. Уровень пролиферативной клеточной активности определяли, используя стандартную процедуру, включающую перенос клеток на стекловолоконный фильтр и учет радиоактивности с помощью жидкостного сцинтилляционно-

го б-счетчика. Индекс стимуляции (ИС) вычисляли по формуле: ИС = опыт (имп/мин) / контроль (имп/мин). Через 2,5 месяца после начала индукции ЭАЭ проводили курс экспериментальной терапии. Мыши получали однократную подкожную инъекцию антиидиотипической вакцины в дозе 5x10⁶ клеток/мышь или 100 мкг/мл ОБМ п/к. Статистическую обработку результатов проводили с помощью непараметрического критерия Манна–Уитни и критерия Каплан и Майер.

Результаты. Показано достоверное (P < 0,001) увеличение количества CD4⁺ в Т-клеточной вакцине (с 21,8±1,2 до 28,2±2,3, P < 0,01). Отмечен 30% прирост абсолютного количества CD4⁺CD44⁺ и CD8⁺CD44⁺Т-клеток памяти в пуле CD4⁺ и CD8⁺Т-клеток со сдвигом в сторону увеличения центральных CD8⁺CD44⁺CD62L⁺Т-клеток памяти, обладающих цитотоксическим потенциалом. Количество активированных регуляторных клеток в Т-клеточной вакцине увеличивалось в разы при стимуляции антигеном (с 0,54±0,4 до 10,5±3,1 P < 0,001). Показано уменьшение неврологической симптоматики у мышей как при лечении Т-клеточной вакциной, так и при использовании антигена в качестве иммунизирующего агента, зафиксировано снижение индекса ЭАЭ через две недели после начала лечения Т-клеточной вакциной в четыре раза (с 2,71±0,36 до 0,57±0,4).

Заключение. Несмотря на наличие клинического улучшения у мышей, мы не отметили значимых изменений параметров Т-клеточного иммунитета в процессе лечения Т-клеточной вакциной. Дальнейшая работа будет посвящена поиску подходов в увеличении количества Т-регуляторных клеток и снижении количества Т-клеток памяти в модели экспериментального аутоиммунного энцефаломиелита.

ОСОБЕННОСТИ ИММУННОГО ОТВЕТА НА ИНТРАГАСТРАЛЬНОЕ ВВЕДЕНИЕ ИНДИГЕННОГО ШТАММА *E. COLI* У САМЦОВ И САМОК КРЫС ЛИНИИ SPRAGUE DAWLEY

Козловская Г.В., Козловский Ю.Е., Силаенкова М.М., Пономаренко Е.А., Косырева А.М.

ФГБНУ «Научно-исследовательский институт морфологии человека», Москва, Россия

Цель. Изучение особенностей реакции иммунной системы и микробиома кишечника на интрагастральное введение потенциального пробиотического штамма *E. coli* EB.

Материалы и методы. Уровни экспрессии генов провоспалительных цитокинов в печени, селезенке и кишечнике самцов и самок крыс линии Sprague Dawley определяли методом количественной ПЦР на Rotor Gene 6000. Изменения качественного и количественного состава микробиома кишечника контрольных и опытных животных определяли посредством бактериологического анализа и методом qPCR путем амплификации специфических для каждого таксона последовательностей гена 16S rRNA. Для выделения нуклеиновых кислот, реакций ПЦР и обратной транскрипции использовали реактивы фирм Евроген, Изоген и ДНК-технологии. Статистическую обработку результатов проводили с использованием программы Statistica 6.

Было установлено, что интрагастральное введение штамма *E. coli* EB (2 недели, в дозе 5 × 10⁹ живых бактерий)

не приводило к значительному изменению иммунного статуса животных, но выявило гендерные различия по показателю уровня продукции IL-2, IL-10 и IL-4, обусловленные действием изучаемого штамма. Анализ просветной и пристеночной микрофлоры подопытных животных продемонстрировал ряд изменений в качественном и количественном составе микробиома, выразившиеся в а) увеличении общего количества микроорганизмов в ЖКТ на 1 порядок; б) уменьшении титра *Bifidobacterium* в 13 раз; в) увеличении содержания индигенных *Lactobacillus* в 12,5 раз; г) увеличении количества представителей рода *Enterococcus* на 1 порядок. Все указанные изменения микробиома носили динамический характер.

Выводы. Продемонстрированы гендерные различия в продукции цитокинов, вызванные введением индигенного штамма *E. coli*. Интрагастральное введение живых микроорганизмов вызывало динамические изменения в микробиоме. Возрастание количества таких микроорганизмов, как лактобациллы и энтерококки, позволяет предполагать наличие у рассматриваемого штамма протективного действия.

Заключение. в результате работы показано, что организмы самцов и самок по-разному реагируют на введение апатогенного штамма, что необходимо учитывать в случае применения пробиотических препаратов.

АКТИВНОСТЬ ЛИМФОЦИТОВ САМОК КРЫС ПРОТИВ МНС САМЦА И РОЛЬ ИММУНОГЛОБУЛИНА G В ЕЕ РЕГУЛЯЦИИ ПРИ БЕРЕМЕННОСТИ

**Коренчук Ю.В., Шайдулина Р.Р., Тронина Т.И.,
Меньшиков И.В., Тютина А.А., Вайтина А.М.**

ФГБОУ ВО «Удмуртский государственный университет», Ижевск, Россия

Введение. Беременность, представляя собой феномен естественной аллотрансплантации, требует наличия эффективных регуляторных механизмов для предупреждения возможных антифетальных иммунных реакций. Сегодня ясно, что иммунологические взаимоотношения между организмами матери и плода являются двусторонним коммуникационным процессом, определенным, с одной стороны, презентацией фетальных антигенов, а с другой – распознаванием и реагированием на эти антигены материнской иммунной системы. Механизмы регуляции активности лимфоцитов матери специфичны к МНС плода, обеспечивающие срочную иммунологическую толерантность к плоду, как полуаллогенному трансплантату, остаются не ясны.

Цель и задачи. Выяснить как изменяется активность лимфоцитов самок крыс по отношению к МНС самца и роль иммуноглобулинов плазмы крови в обеспечении толерантности к плоду.

Материалы и методы. Были использованы девственные самки крыс Wistar ($n = 19$) и самцы линии Wistar-Kyoto (WKY) ($n = 9$) и самцы Wistar ($n = 10$). Самки и самцы после объединения содержались парами. Беременность наступала в течение 1 или 2 недель после объединения крыс. Была исследована пролиферативная активность лимфоцитов самок крыс в однонаправленной смешанной культуре с лимфоцитами самца еженедельно после объединения животных в пару, а также непосредственно перед объединением. Лимфоциты культивировали в течение 5 дней в полной питательной среде. Активность лимфоцитов самки оценивали

по потреблению глюкозы. Для выяснения роли аутоплазмы и содержащихся в ней иммуноглобулинов в регуляции активности лимфоцитов самки, специфичных к лимфоцитам самца, лимфоциты самок перед культивированием инкубировали в течение 1 часа с аутоплазмой и с аутоплазмой, очищенной от IgG, затем лимфоциты отмывали от несвязавшихся факторов плазмы. Плазма содержала комплемент, поэтому при инкубировании лимфоцитов с аутоплазмой мог быть реализован цитотоксический эффект антител.

Результаты. Обнаружено, что лимфоциты девственных самок отвечают на лимфоциты самцов. Предварительная обработка лимфоцитов самок аутоплазмой в 47% случаях не влияет на активность лимфоцитов самок, вызванную лимфоцитами самца, в 37% – стимулирует, в 16% – подавляет. Таким образом, примерно у половины исследованных девственных самок крыс Wistar в плазме крови присутствуют факторы, осуществляющие регуляцию активности лимфоцитов в отношении МНС антигенов самцов Wistar или самцов линии WKY. В основном факторы плазмы стимулируют активность лимфоцитов в отношении данных антигенов. Удаление IgG из плазмы самок девственных крыс не приводило к отмене эффекта плазмы, оказывающей ингибирующее воздействие на лимфоциты самок, но отменяло эффект плазмы, оказывающей стимулирующий эффект. Следовательно, стимулирующий эффект аутоплазмы на активность лимфоцитов девственных самок, вызванную лимфоцитами самца, ассоциирован с IgG, а ингибирующий – с другими факторами плазмы. У беременных крыс на 1 неделе беременности пролиферация лимфоцитов в ответ на лимфоциты самца в 2 раза ниже ($p < 0,05$, t-test), чем до беременности, на 2 неделе возвращается к уровню до беременности, а на 3 неделе – в 2 раза выше, чем до беременности ($p < 0,05$, t-test). В течение всей беременности в аутоплазме самок присутствуют факторы, стимулирующие пролиферативную активность лимфоцитов самок, вызванную лимфоцитами самца. Аутоплазма, лишенная IgG, сохраняет стимулирующую активность, но в некоторых случаях последняя снижается после удаления IgG. Данный факт позволяет предполагать, что стимулирующий эффект плазмы при беременности обусловлен не IgG, возможно иммуноглобулином класса М. Наоборот, у беременных крыс обнаруживается IgG, который ограничивает стимулирующую активность плазмы. Об этом свидетельствует увеличение стимулирующего эффекта аутоплазмы на пролиферацию лимфоцитов самки, вызванную лимфоцитами самца, после ее истощения от IgG. Возможно, сдерживание экспансии лимфоцитов самки против МНС самца и, следовательно, плода иммуноглобулинами класса G участвует в поддержании толерантности к плоду.

Заключение. Таким образом, факторы плазмы крови постоянно поддерживают активность лимфоцитов специфичных к чужеродным МНС. Во время беременности стимулирующая активность плазмы в отношении лимфоцитов специфичных к чужеродным МНС сдерживается IgG. Возможно, появление IgG, ограничивающего стимулирующую активность плазмы в отношении лимфоцитов специфичных к МНС самца, обеспечивает снижение активности лимфоцитов самки к МНС в первой половине беременности и сохранение плода.

ПОЛОВЫЕ РАЗЛИЧИЯ МОРФОЛОГИЧЕСКИХ И ИММУНОЛОГИЧЕСКИХ ИЗМЕНЕНИЙ ПРИ СИСТЕМНОМ ВОСПАЛИТЕЛЬНОМ ОТВЕТЕ У КРЫС ВИСТАР С РАЗНОЙ УСТОЙЧИВОСТЬЮ К ГИПОКСИИ

Косырева А.М., Джалилова Д.Ш., Макарова О.В.

ФГБНУ «Научно-исследовательский институт морфологии человека», Москва, Россия

Введение. По данным литературы устойчивость к развитию инфекционно-воспалительных заболеваний, тяжесть их течения и такие показатели как выживаемость и смертность, зависят от пола (Eshima N. et al., 2012). Известно, что при системном воспалительном ответе (СВО) экспрессия ключевого фактора, регулирующего продукцию провоспалительных цитокинов – NF-κB, тесно связана с активацией транскрипционного фактора, регулирующего ответ на гипоксию – HIF-1, уровень экспрессии которого варьирует у особей с высокой и низкой устойчивостью к гипоксии (Nigota K., 2015). При лечении больных с синдромом СВО и сепсиса, как правило, не учитывается индивидуальная устойчивость к гипоксии, а также половые различия, что снижает эффективность терапевтических мероприятий.

Цель и задачи. Оценка половых различий морфологических и иммунологических изменений при СВО у крыс Вистар с разной устойчивостью к гипоксии.

Материалы и методы. Исследования проведены на половозрелых крысах Вистар обоего пола (n = 40), массой тела 220–270 г (питомник «Столбовая»). Для определения устойчивости к гипоксии животных помещали в барокамеру на «высоту» 11 500 м, подъем осуществляли со скоростью 80 м/с. К высокоустойчивым к гипоксии животным относили крыс, время жизни (время до принятия бокового положения) которых «на высоте» составляло более 3 мин, к низкоустойчивым – менее 30 сек. Через 2 недели после определения устойчивости к гипоксии моделировали СВО путем внутрибрюшинного введения липополисахарида *E. coli* O26:B6 (Sigma) в дозе 1,5 мг/кг, вызывающей развитие воспалительного процесса и дистрофических изменений в органах-мишенях – печени и легких. Животных выводили из эксперимента через 24 ч после введения ЛПС передозировкой общего анестетика золетила (Virbac Sante Animale). Оценивали морфологические изменения в легких и печени. Проводили цитофлуориметрическую оценку относительного и абсолютного количества CD3⁺CD4⁺, CD3⁺CD8⁺, CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺, CD45⁺, CD314⁺-лимфоцитов в периферической крови. Для оценки статистической значимости полученных результатов использовали методы непараметрической и дисперсионной статистики (Манна–Уитни, Коннор-АNOVA).

Результаты. На 1-е сутки после введения ЛПС у низкоустойчивых к гипоксии самцов и самок воспалительная инфильтрация межальвеолярных перегородок была более выражена, чем у высокоустойчивых животных. При анализе половых различий у высокоустойчивых к гипоксии крыс было показано, что воспалительная инфильтрация в легких более выражена у самцов. Однако у низкоустойчивых самцов и самок различий по этому показателю не обнаружено.

В ранние сроки развития СВО по сравнению с высокоустойчивыми к гипоксии самками и самцами в печени низкоустойчивых животных обоего пола чаще выявлялись очаговые некрозы, дистрофические изменения гепатоцитов были более распространенными и выражен-

ными. Половых различий морфологических изменений в печени как у низко-, так и высокоустойчивых крыс не выявлено.

При развитии СВО в периферической крови у низкоустойчивых к гипоксии самцов выявлено снижение абсолютного числа Т-лимфоцитов и повышение В-лимфоцитов, тогда как у высокоустойчивых наблюдалось снижение количества всех исследуемых Т-лимфоцитов: хелперов, цитотоксических и регуляторных, что свидетельствует о более выраженной иммуносупрессии у высокоустойчивых к гипоксии самцов. При введении ЛПС низкоустойчивым к гипоксии самкам через 24 ч в периферической крови было выявлено только повышение числа CD314⁺NK-клеток, тогда как у высокоустойчивых – увеличение числа NK клеток сопровождалось выраженным снижением количества В-лимфоцитов, Т-хелперов, цитотоксических и регуляторных Т-лимфоцитов, что, так же как и у самцов, отражает более выраженную иммуносупрессию у высокоустойчивых к гипоксии самок с СВО. По сравнению с высокоустойчивыми к гипоксии самками введение ЛПС высокоустойчивым самцам приводило к более выраженному снижению числа субпопуляций лимфоцитов в периферической крови. Половых различий изменения количества основных субпопуляций в крови у низкоустойчивых к гипоксии крыс выявлено не было.

Заключение. По сравнению с низкоустойчивыми к гипоксии крысами у высокоустойчивых животных обоего пола воспалительные изменения в легких и альтеративные процессы в печени менее выражены, что сочетается с более выраженным снижением числа Т-лимфоцитов в периферической крови. При анализе половых различий у крыс с высокой устойчивостью к гипоксии показано, что, по сравнению с самками, у самцов воспалительная инфильтрация в легких и ЛПС-индуцированное снижение количества Т-лимфоцитов в крови более выражены. Выявленные половые различия и особенности течения СВО у особей с разной устойчивостью к гипоксии следует учитывать при разработке новых подходов к персонализированной терапии синдрома СВО и сепсиса.

ВЛИЯНИЕ RHODOCOCCLUS-БИОСУРФАКТАНТА И ЕГО ДОМИНИРУЮЩЕЙ ФРАКЦИИ НА ВЫРАЖЕННОСТЬ ГУМОРАЛЬНОГО ОТВЕТА В СИСТЕМЕ IN VIVO

Кочина О.А., Куюкина М.С., Ившина И.Б.

Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН, Пермь, Россия

Введение. Биосурфактанты являются поверхностно активными веществами, имеющими микробное происхождение. В отличие от синтетических аналогов, они обладают рядом преимуществ, благодаря чему являются перспективными соединениями для использования в различных областях. Доказана возможность их применение и в медико-биологических целях. Биосурфактанты обладают противоопухолевой, антимикробной и противовирусной активностью. Однако патогенность штаммов-продуцентов и токсичность биосурфактантов ограничивают их использование. Штамм *Rhodococcus ruber* ИЭГМ 231 является патогенным, а синтезируемый им биосурфактант не токсичен для животных.

Цель. Исследование влияния гликолипидного комплекса *Rhodococcus ruber* ИЭГМ 231 и его доминирующей фракции на выраженность антитителогенеза в системе *in vivo* при различных способах введения.

Материалы и методы. Эксперименты были проведены на белых беспородных мышках-самцах массой 20-25 г. Контрольной группе вводился 0,9% NaCl, а опытным группам – препарат в виде гликолипидного комплекса (25, 50 и 100 мг/кг) или его доминирующей фракции (100 мг/кг). Введение исследуемого биосурфактанта осуществлялось двумя способами: внутривентриально и внутримышечно (правая задняя лапа). Через час после введения трегалолипида, животных иммунизировали эритроцитами. На 5-ые сутки, на пике иммунного ответа, определялось количество АОК в селезенке методом локального гемолиза в геле агарозы. Мышей выводили из эксперимента путем декапитации с соблюдением требований гуманности, согласно конвенции (Страсбург, 1986). Статистическую обработку проводили с использованием однофакторного дисперсионного анализа и непарного LSD-критерия для *post-hoc* сравнения.

Результаты. Установлено, что при в/б введении гликолипидного комплекса препарат в дозах 50 и 100 мг/кг оказывал статистически значимое угнетающее влияние на количество антителообразующих клеток в селезенке по относительным показателям. При оценке изменений абсолютного числа АОК статистически значимого влияния гликолипидного биосурфактанта обнаружено не было. Число ядросодержащих клеток селезенки под воздействием трегалолипида также статистически значимо не изменялось, но при этом наблюдалась тенденция к повышению динамики клеточности органа при введении препарата в дозах 50 и 100 мг/кг. Установлено, что при в/м введении препарат оказывал статистически значимый эффект на угнетение антителогенеза путем снижения количества АОК во всех трех дозах в расчете как на миллион, так и на весь орган. Как и при в/б введении биосурфактанта, наблюдалась тенденция к увеличению количества ядросодержащих клеток в селезенке.

При в/б и в/м введении доминирующей фракции трегалолипида было установлено, что препарат оказывал угнетающее действие на абсолютное и относительное количество антителообразующих клеток в селезенке. Количество ядросодержащих клеток под действием фракции статистически значимо угнеталось при различных способах введения. Наибольший эффект был зафиксирован при в/м введении препарата.

Заключение. Таким образом, биосурфактант *Rhodococcus ruber* ИЭГМ 231 и его доминирующая фракция оказывает угнетающий эффект на относительное и абсолютное количество антителопродуцентов в селезенке при различных способах введения. Наличие иммунорегуляторной активности биосурфактанта свидетельствует о перспективности дальнейшего исследования данного микробного трегалолипида.

СЕМАФОРИН SEMA4D В КОНТРОЛЕ РАННИХ ЭТАПОВ АКТИВАЦИИ Т-ЛИМФОЦИТОВ

Куклина Е.М., Некрасова И.В., Валиева Ю.В.

Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН, Пермь, Россия

Семафорин IV класса Sema4D – многофункциональная молекула, которая широко представлена в организме, в том числе в иммунной системе. Он конститутивно экспрессируется Т- и В-лимфоцитами, а при активации клеток за счет протеолитического отщепления переходит в растворимую форму, не теряя при этом функциональной активности. Показано, что лимфоциты экспрессируют как сам семафорин, так и два типа семафориновых

рецепторов, CD72 и плексин В1, что определяет участие Sema4D в контроле активности этих клеток и возможность ауто- или паракринного действия семафорина. В работе исследована роль эндогенного Sema4D в регуляции ранних этапов активации лимфоцитов, в частности, в реализации трех возможных вариантов ответа клеток на стимуляцию – пролиферации, апоптоза или анергии. При этом, наряду с функциональным ответом клеток (пролиферация, апоптоз) и экспрессией диацилглицеринкиназы α (Diacylglycerol kinases α , DGK α), маркера анергии, оценивался синтез клетками продуктов генов раннего ростового ответа 1 и 2 (Early growth response, Egr1 и Egr2), определяющих выбор клеткой пути развития – пролиферации или анергии, соответственно. Источником эндогенного Sema4D в культуре служили сами Т-лимфоциты. Для оценки роли Sema4D в активации лимфоцитов использовали блокаду как семафорина, так и обоих семафориновых рецепторов, CD72 и плексина В1.

Показано непосредственное участие Sema4D в пролиферативном ответе CD4⁺/CD8⁺Т-лимфоцитов на поликлональную активацию (анти-CD3/CD28), а также в стимуляции экспрессии транскрипционного фактора Egr1, ассоциированного с адекватной активацией Т-лимфоцитов: оба показателя снижались на фоне блокады семафорина, Уровень активационно-индуцированного апоптоза, напротив, возрастал в случае блокады Sema4D, указывая на его антиапоптотическую активность. Анализ вклада конкретных рецепторов в реализацию антиапоптотических эффектов Sema4D в CD4⁺/CD8⁺Т-лимфоцитах выявил участие в этом процессе плексина В1. Оценка роли Sema4D в индукции Т-клеточной анергии показала следующие результаты. экспрессия DGK α , ключевого маркера анергии, на фоне блокады семафорина статистически значимо снижалась. При этом подавлялась и экспрессия транскрипционного фактора Egr2. Известно, что Egr2 инициирует транскрипцию DGK α , а его экспрессия ассоциирована с Т-клеточной анергией, поэтому однотипная регуляция этих факторов семафорином вполне закономерна, однако направленность этих изменений неожиданна, поскольку идет вразрез с показанным выше участием Sema4D в активации Т-лимфоцитов за счет про-пролиферативных и антиапоптотических эффектов.

В целом полученные результаты позволяют сделать ряд заключений: 1) Sema4D контролирует не только пролиферацию Т-лимфоцитов, но и альтернативные варианты ответа клеток на стимуляцию – активационно-индуцированный апоптоз и анергию; 2) одним из механизмов Sema4D-зависимого контроля активации лимфоцитов является регуляция экспрессии продуктов генов раннего ростового ответа Egr1/Egr2; 3) в реализации эффектов семафорина в Т-лимфоцитах участвует плексин В1, экспрессия которого ранее приписывалась исключительно неиммунным тканям; 4) эффекты Sema4D в Т-лимфоцитах, как правило, не зависят от растворимого семафорина и требуют экспрессии его мембранной формы. Важно также отметить показанную в работе способность Sema4D усиливать экспрессию Т-лимфоцитами маркеров анергии. Известно, что анергичный статус имеет субпопуляция регуляторных Т-клеток, поэтому не исключено, что Sema4D участвует в дифференцировке данных клеток.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 15-04-05694.

КЛЕТочНЫЕ ТЕХНОЛОГИИ В КОРРЕКЦИИ НАРУШЕНИЙ АДАПТИВНОГО И ВРОЖДЕННОГО ИММУНИТЕТА ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ОСТРОЙ ИШЕМИИ ПЕЧЕНИ

Литвинова Е.С., Конопля А.И., Быстрова Н.А., Харченко А.В., Конопля Н.А.

Курский государственный медицинский университет,
Курск, Россия

Введение. Для более широкого внедрения заместительной клеточной терапии в клиническую практику необходимы дальнейшие экспериментальные исследования, направленные на определение иммунометаболических эффектов различных вариантов регенеративной клеточной терапии (использование аллогенных гепатоцитов и их культуральной жидкости), а также сочетанное применение аллогенных гепатоцитов и фармакологических препаратов при патологии печени.

Цель и задачи. Установить эффективность коррекции иммунных нарушений в условиях острой ишемии печени путем использования аллогенных гепатоцитов (АГ) и их культуральной жидкости (КЖАГ).

Материалы и методы. Исследования проведены на 88 здоровых крысах-самцах Вистар массой 150-200 г. Острую ишемию печени (ОИП) вызывалась оперативным методом под внутрибрюшинным гексеналовым наркозом путем пережатия гепатодуоденальной в течение 10 минут. Выделение АГ от животных через 5-6 дней после рождения производилась по методике M.N. Berry, D.S. Friend. Полученный пул суспензии клеток от 3 крыс в концентрации 2×10^6 /кг сразу же вводили внутрибрюшинно, десятикратно, через 24 часа, в объеме 0,5 мл в среде 199. С целью получения КЖАГ АГ культивировали в среде 199 (5×10^7 клеток на 3 мл среды), содержащей 5% телячьей эмбриональной сыворотки, в течение 4 ч. После чего клетки осаждали центрифугированием, а КЖАГ десятикратно (с 24-часовым интервалом) внутрибрюшинно вводили реципиентам из расчета 5 мг/кг белка. АГ и КЖАГ готовили ежедневно и вводили сразу же после приготовления. Экспериментальных животных делили на 4 группы по 11-12 особей в каждой: 1-я группа (контрольная) – здоровые крысы; 2-я группа – ОИП; 3-я группа – ОИП и введение АГ; 4-я группа – ОИП и введение КЖАГ. Смертность экспериментальных животных во 2-4 группах в течение 5 дней после моделирования ОИП соответственно составила 34%, 21% и 17%. В циркулирующей крови определяли функционально-метаболическую активность нейтрофилов, в селезенке число иммунных антителообразующих клеток (АОК) на эритроциты барана. О выраженности реакции гиперчувствительности замедленного типа (ГЗТ) на эритроциты барана судили по разнице масс (РМ) регионарного и контрлатерального лимфатических узлов и по разнице количества в них кариоцитов (РК).

Результаты. В условиях ОИП у животных установлена супрессия формирования гуморального иммунного ответа (снижение количества иммунных АОК в селезенке) и ГЗТ (снижение разницы РМ и РК регионарных и контрлатеральных лимфатических узлов), снижение метаболической и фагоцитарной активности нейтрофилов периферической крови (снижение ФИ, ФЧ, НСТ-сп., НСТ-ст.). Введение АГ реципиентам с ОИП нормализует ФЧ нейтрофилов периферической крови и их кислород-зависимую активность по НСТ-ст., корректирует, но не до уровня контрольной группы животных, ФИ полиморфно-ядерных лейкоцитов периферической крови и повышает более значительно, по сравнению с контролем,

формирование ГЗТ. Введение КЖАГ крысам с гипоксией печени нормализует формирование клеточной формы иммунного ответа и ФИ нейтрофилов периферической крови, частично нормализует развитие гуморального звена иммунитета, ФЧ и кислород-зависимую функциональную активность полиморфно-ядерных лейкоцитов.

Заключение. Для бескровных манипуляций на печени в клинической практике нередко используется пережатие печеночно-дуоденальной связки. Однако, возникающая при этом ишемия печени может быть причиной не только резких нарушений функции этого органа, но и оказывает отрицательное влияние на весь организм в целом, в первую очередь через возникающее иммунодефицитное состояние. Применение в этих условиях трансплантации гепатоцитов и их культуральной жидкости корректирует в экспериментальных условиях нарушения иммунитета. По-видимому, трансплантированные изолированные гепатоциты не только изменяют гуморальные и молекулярные механизмы, отвечающие за активацию функции поврежденных гепатоцитов реципиента и регенерацию, но и активируют функцию иммунокомпетентных клеток путем выработки гуморальных соединений.

КРАТКОСРОЧНОЕ КУЛЬТИВИРОВАНИЕ МОНОНУКЛЕАРНЫХ ЛЕЙКОЦИТОВ С РЕЛЬЕФНЫМ КАЛЬЦИЙ-ФОСФАТНЫМ ПОКРЫТИЕМ НА ТИТАНЕ

Литвинова Л.С.¹, Юрова К.А.¹, Шуплецова В.В.¹, Мелащенко Е.С.¹, Хазиахматова О.Г.¹, Шаркеев Ю.П.^{2,4}, Хлусов И.А.^{1,2,3}

¹ Балтийский федеральный университет им. И. Канта, Калининград, Россия

² Томский политехнический университет, Томск, Россия

³ Сибирский государственный медицинский университет, Томск, Россия

⁴ Институт физики прочности и материаловедения СО РАН, Томск, Россия

Введение. Известно, что стандартная тест-система в двумерной (2D) стационарной культуре клеток на пластиковой поверхности культуральных планшетов не соответствует условиям реального функционирования клеточных систем, отличаясь многими параметрами, в том числе активацией рецепторов и внутриклеточных сигнальных путей, от естественного микроокружения клеток *in vivo*. Использование искусственных трехмерных (3D) матриц, способных биомиметически воспроизводить клеточное и тканевое микроокружение, позволяет формировать условия, приближенные к *in vivo* и проводить экспериментальные работы на межфазной границе раздела живой и неживой материи.

Цель. Изучение влияния 3D-матриц, имитирующих минеральное вещество регенерирующей костной ткани, на состояние мононуклеарных лейкоцитов (МНК) в краткосрочной культуре *in vitro*.

Материалы и методы. Материалом исследования служили МНК, выделенные из лейкоцезы здоровых доноров методом центрифугирования в градиенте плотности фиколл-урографин ($1,077 \text{ г/см}^3$) (Pharmacia, Швеция) и культивировали (3×10^6 кл/лунку) в полной питательной среде в течение 48 часов при 37°C , во влажной атмосфере, содержащей 5% CO_2 . Состояние трехмерной (3D) культуры клеток имитировали при помощи добавления в клеточную культуру подложек ($10 \times 10 \times 1 \text{ мм}^3$) из коммерчески чистого титана, несущих рельефное кальций-

фосфатное (КФ) покрытие. Физиологической модели репарации соответствовал индекс шероховатости (Ra) размером 2–3 мкм. Ra образцов для репаративной модели учитывал больший объем ремоделирования кости при ее травматических повреждениях и был равен 3–5 мкм. Контролем служила 2D-модель *in vitro* культивирования клеток на пластике (контроль). Иммунофенотипирование клеток проводили методом проточной цитометрии с использованием коктейля моноклональных антител, меченных флюоресцентными метками ViaBlue, FITC, PE, (eBioscience, USA) на проточном цитометре MACS Quant (Miltenyi Biotec, Германия). Количественное определение IL-2 в супернатантах исследуемых культур клеток проводили методом проточной флюориметрии на автоматизированном анализаторе (Bio-Plex Protein Assay System, Bio-Rad, США) с использованием коммерческих тест-систем (Bio-PlexProHuman cytokine Group I Assays, Bio-Rad, США). Исследование уровня транскрипции мРНК генов (*hTERT*, *ki-67*, *IL-2*) проводили методом ПЦР. Последовательности олигонуклеотидных праймеров, а также протоколы амплификации описаны ранее. Статистическая обработка результатов осуществлялась с помощью программы IBM SPSS Statistics 20.

Результаты и обсуждение. По истечении срока инкубации (48 ч) в физиологической и в репаративной моделях культивирования было выявлено статистически достоверное увеличение содержания CD4⁺CD71⁺ лимфоцитов и продукции IL-2 в сравнении с контрольной 2D-культурой ($p \leq 0,05$), при этом уровень относительной экспрессии мРНК гена IL-2 в обеих моделях культивирования был сопоставим с контрольными значениями. Транскрипция мРНК гена *ki-67*, свидетельствующая о пролиферативной активности клетки, повышалась (в 6 раз) только в репаративной 3D-модели культивирования *in vitro*. Анализ динамики теломеразной активности, обеспечивающей репликативную способность высокопролиферирующих МНК, не выявил статистически значимого изменения относительной экспрессии мРНК гена *hTERT* как в физиологической, так и в репаративной 3D-моделях культивирования по сравнению с контролем.

Заключение. 3D-матрикс, имитирующий регенерацию костной ткани, стимулирует пролиферативную активность МНК, предположительно за счет эпигеномного характера действия рельефа кальций-фосфатной поверхности. Установлено различие в механизмах пролиферации МНК в репаративной и физиологической моделях 3D-матрикса.

Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект 16-15-10031).

ДОФАМИН КАК РЕГУЛЯТОР РАЗВИТИЯ ТИМУСА У ПЛОДОВ КРЫС

Лифанцева Н.В., Конеева Ц.О., Воронова С.Н., Мельникова В.И.

ФГБУН «Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова» РАН, Москва, Россия

Введение. В последнее время существенно изменились представления о мономинах как исключительно о передатчиках сигнала между клетками нервной системы. Все больше данных подтверждает их способность выступать в качестве гуморальных регуляторов широкого профиля в различных органах и тканях. Иммунная система является одним из примеров проявления такого действия мономинов. Известно, что дофамин синтезируется лимфоцитами и участвует в модуляции иммунных реакций посред-

ством ауто- и паракринных механизмов у половозрелых млекопитающих. Исследование роли дофамина в раннем развитии имеет особое значение, поскольку вмешательство в формирование различных структур плода приводит к долговременным необратимым изменениям в постнатальном периоде онтогенеза. Ранее нами было показано, что дефицит катехоламинов на определенных стадиях пренатального развития приводит к необратимым морфогенетическим изменениям в функционировании Т-клеточного звена иммунитета как в препубертатном, так и в постпубертатном периодах жизни. Однако оставалось невыясненным, какой конкретно из катехоламинов ответственен за обнаруженные эффекты. У плодов, в отсутствии гемато-энцефалического барьера, дофамин может выделяться из мозга в систему общей циркуляции, и его концентрация в крови плодов значительно выше, чем уровень норадреналина и адреналина. Высокая концентрация дофамина в крови плодов, а также отсутствие нарушений в развитии иммунной системы у мышей с нокаутом гена дофамин-β-гидроксилазы, необходимой для синтеза норадреналина и адреналина, позволили нам предположить, что именно дофамин является регулятором формирования тимуса у плодов крыс.

Цель и задачи. В данной работе исследовали экспрессию рецепторов к дофамину и их функциональную активность в эмбриональном тимусе, а также отдаленные последствия пренатального подавления синтеза катехоламинов в критический период формирования тимуса на дифференцировку субпопуляций Т-лимфоцитов в этом органе у половозрелых животных.

Материалы и методы. Возрастную динамику экспрессии рецепторов к дофамину в тимусе оценивали методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с обратной транскрипцией у плодов, начиная с 16-го дня эмбрионального развития (Э16). Функциональную активность дофаминовых рецепторов на клетках тимуса оценивали *in vitro* на Э18 по способности дофамина влиять на пролиферативный ответ, индуцированный митогеном конканавалином А (Кон А, 2,5 мкг/мл). Для подавления синтеза катехоламинов у плодов беременным самкам крыс Вистар внутрибрюшинно вводили α-метил-п-тирозин (α-МПТ, 100 мг/кг массы). У родившегося потомства на 40-й день постнатального развития (П40) в тимусе проводили количественную оценку субпопуляций Т-лимфоцитов, путем окрашивания клеток антителами к поверхностным маркерам CD4, CD8 и CD25 (Cederlain, Канада) с последующим анализом на проточном цитофлуориметре Coulter EPICS XL-MCL (Beckman, США).

Результаты. Согласно полученным данным, в эмбриональном тимусе обнаружена экспрессия мРНК рецепторов к дофамину D1, D2, D3 и D5 типов. Возрастная динамика экспрессии рецепторов всех изученных типов различна. Тем не менее, следует отметить, что на Э17 уровень экспрессии мРНК относительно высокий для всех типов дофаминовых рецепторов. Добавление дофамина в культуру тимоцитов, выделенных из плодов на Э18, достоверно снижало ответ тимоцитов на митоген КонА для всех использованных концентраций (10^{-8} – 10^{-6} М). Полученные данные свидетельствуют о функциональной активности рецепторов к дофамину на тимоцитах и подтверждают возможность прямого влияния дофамина на развивающийся тимус. Анализ клеточного состава субпопуляций тимоцитов у взрослых крыс, которым фармакологически подавляли синтез катехоламинов на стадиях Э16–17 не выявил различий в динамике созревания

Т-клеток CD4-фенотипа и CD8-фенотипа, при этом обнаружил увеличение численности естественных регуляторных Т-лимфоцитов CD4⁺CD25⁺ фенотипа, основная функция которых заключается в обеспечении толерантности на периферии.

Заключение. Таким образом, подавление синтеза катехоламинов в критический период формирования тимуса (Э16-Э17) приводит к долгосрочным изменениям в Т-системе иммунитета, обусловленным усилением продукции естественных регуляторных Т-лимфоцитов. Присутствие и функциональная активность в тимусе плодов рецепторов к дофамину D1, D2, D3 и D5 типов свидетельствует в пользу того, что именно дофамин ответствен за описанные эффекты, и подтверждает возможность прямого влияния дофамина на формирование тимуса.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ № 16-04-00031.

ЭКСПРЕССИЯ КОМПОНЕНТОВ МОНОАМИНЕРГИЧЕСКОЙ СИСТЕМЫ В РАЗВИВАЮЩЕМСЯ ТИМУСЕ

Лифанцева Н.В., Конева Ц.О., Мельникова В.И.

ФГБУН «Институт биологии развития им.
Н.К. Кольцова» РАН, Москва, Россия

Введение. Исследование роли моноаминов в пренатальном развитии имеет особое значение, поскольку при формировании различных структур плода реализуются эпигенетические механизмы, обеспечивающие адаптивную пластичность всех систем организма. Ранее было показано, что дефицит серотонина или дофамина в период активного формирования тимуса у плодов крыс приводит к необратимым морфогенетическим изменениям в функционировании Т-клеточного звена иммунитета в постнатальной жизни. Однако механизмы такого действия моноаминов остаются невыясненными. У половозрелых животных все компоненты моноаминергической системы (синтез, захват, рецепторы) тем или иным образом задействованы в модуляции иммунных реакций. Возможность синтеза моноаминов и их захвата в клетках иммунной системы, а также экспрессия рецепторов в пренатальном онтогенезе не изучены.

Цель и задачи. В настоящей работе исследовали возрастную динамику экспрессии рецепторов к серотонину и дофамину, а также возможность синтеза и транспорта моноаминов в клетках тимуса у плодов крыс.

Материалы и методы. Возрастную динамику экспрессии рецепторов к серотонину и дофамину, в тимусе оценивали методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с обратной транскрипцией у плодов, начиная с 15-го дня эмбрионального развития (Э15). Экспрессию молекул-транспортеров и ферментов синтеза серотонина и дофамина исследовали методами ПЦР и Вестерн-блоттинга. Способность тимоцитов на 18-й эмбриональный день к захвату внеклеточных моноаминов оценивали с помощью конфокальной микроскопии живых клеток, которые инкубировали с флуоресцирующим субстратом транспортеров моноаминов (ASP⁺ 10⁻⁷ М) в присутствии или без селективных блокаторов захвата серотонина (флюоксетин 10⁻⁵ М) или дофамина (GBR-12909 10⁻⁵ М).

Результаты. В тимусе плодов, начиная с Э15-Э16, обнаружена мРНК рецепторов к серотонину (5-HT-1a, 5-HT-1b-, 5-HT-2a, 5-HT-2b и 5-HT-7) и рецепторов к дофамину (D1, D2, D3, D5). Ферменты синтеза серотонина и дофами-

на – триптофангидроксилаза, тирозингидроксилаза и декрбоксилаза ароматических аминокислот выявлены в тимусе плодов начиная с 16-го дня с помощью методов ПЦР и Вестерн-блоттинга. Инкубация эмбриональных тимусов (Э18) *ex vivo* в присутствии предшественников серотонина и дофамина (триптофана или тирозина) с последующим иммуногистохимическим выявлением серотонина или дофамина, соответственно, позволила подтвердить функциональную активность обнаруженных ферментов. Подавление транспорта ASP⁺ в клетки тимуса (Э18) в присутствии селективных ингибиторов транспорта серотонина и дофамина доказывает способность клеток эмбрионального тимуса активно захватывать внеклеточные моноамины.

Заключение. Таким образом, в развивающемся тимусе плодов крыс присутствуют и функционально активны все компоненты серотонинергической и дофаминергической систем (синтез, транспорт, рецепторы), что подтверждает возможность прямого влияния моноаминов на формирование тимуса. Существование локальной моноаминергической системы в эмбриональном тимусе, наряду с высоким уровнем моноаминов в крови плодов, свидетельствует о возможности реализации эффектов моноаминов как через паракринные, так и через эндокринные механизмы, а также позволяет предположить различные функции внутритимического и циркулирующего пулов моноаминов в регуляции развития тимуса.

РОЛЬ ПРОТЕАСОМ И ШАПЕРОНОВ В РЕАКТИВНОСТИ МНОГОКЛЕТОЧНЫХ ОРГАНИЗМОВ ПРИ ИНФИЦИРОВАНИИ ВИРУСАМИ И ПАТОГЕНАМИ

Люпина Ю.В., Становова М.В., Ерохов П.А.,
Абатурова С.Б., Горностаев Н.Г., Михайлов В.С.,
Шарова Н.П.

ФГБУН «Институт биологии развития
им. Н.К. Кольцова» РАН, Москва, Россия

Реактивность при воздействии неблагоприятных факторов у многоклеточных организмов является ключевым звеном в их способности к адаптации. Протеолитическая активность протеасом, их полипептидный состав и физико-химические свойства, регулируются в соответствии с состоянием клеток и действием внеклеточных сигналов.

Целью настоящей работы было выяснение особенностей функционирования убиквитин-протеасомной системы (УПС) и шаперонов при индукции бактериальной или вирусной инфекции в клетках беспозвоночных и млекопитающих, а именно: у эволюционно удаленных классов беспозвоночных, в целомочитах кольчатых червей *Arenicola marina* (кл. Polychaeta) и Sf9 клетках кукурузной листовой совки *Spodoptera frugiperda* (кл. Insecta), и в клетках ЦНС и лимфоидных органов у крыс. Клетки Sf9 были инфицированы бакуловирусом AcMNPV, воспаление у кольчатых червей и крыс вызывалось инъекцией липополисахарида. Реакцию УПС и шаперонов в клетках оценивали через 30 мин, 1 час, 6 часов и 24 часа после инфицирования. Для определения характеристик пулов протеасом и изменения соотношения различных форм при инфицировании у беспозвоночных и млекопитающих изучены нативные формы протеасом методом модифицированного нативного фореза и определено содержание 20S- и 26S форм протеасом, а также их регуляторов с помощью метода Вестерн-блоттинга и специфичных антител в осветленные экстрактах из целомочитов аннелид, Sf9 клеток

насекомых, а также клеток печени, селезенки и отделов головного мозга крыс. Содержание иммунных протеасом в клетках у крыс выявлялось с использованием антител к иммунным субъединицам LMP7 и LMP2. Определение химотрипсин- и каспазаподобной активностей протеасом в осветленных гомогенатах выявлялось по скорости деградации специфического флуорогенного олигопептида N-Succinyl-Leu-Leu-Val-Tyr-7-amido-4-methylcoumarin и Z-Leu-Leu-Glu-7-amido-4-methylcoumarin, которые утилизируются химотрипсин- и каспазаподобными центрами протеасом, соответственно. Вклад примесных активностей оценен с помощью конкурентного ингибитора протеасом, MG132. Роль протеасомных механизмов в регуляции воспаления изучена при фармакологическом воздействии специфических ингибиторов активности протеасом (бортезомиба). Распределение протеасом по клеткам было исследовано методом иммунофлуоресценции. Уровень регуляторов экспрессии иммунных субъединиц протеасом – белков шаперонов HSP/HSC70 оценен методом Вестерн-блоттинга с применением специфических антител. В клетках Sf9, в целомочитах аннелид и в клетках изученных органов у крыс при инфицировании возрастало содержание индуцибельных белков теплового шока HSP70. Впервые была изучена нативная структура протеасом в целомочитах кольчатых червей и Sf9 клетках насекомых с помощью модифицированного метода двумерного электрофореза для грубых фракций протеасом, первое направление которого выполняется в нативных условиях, что позволяет дифференцировать множественные формы протеасом. В ходе работы выделены протеасомы из клеток насекомых и изучен их полипептидный состав методами протеомного анализа (двумерный электрофорез в полиакриламидном геле и масс-спектрометрия). При электрофорезе в полиакриламидном геле в нативных условиях экстрактов клеток *S. frugiperda*, также клеток исследованных органов крыс, протеолитическая активность выявляется во фракциях 26S (комплекс CP и RP) и 20S протеасом (CP), ассоциированных с различными активаторами. В целомочитах кольчатых червей *A. marina* протеасомы были представлены преимущественно формой 20S. Инфекция бакуловирусом AcMNPV не приводила к значимому изменению субъединичного состава протеасом клеток *S. frugiperda*. В клетках печени и коры головного мозга у крыс наблюдалась диссоциация активаторов в пулах 26S и 20S протеасом через 1 и 6 часов после инфицирования. При воспалении, вызванном введением липополисахарида, форма 26S в целомочитах аннелид полностью исчезает, а электрофоретическая подвижность фракции 20S протеасом возрастает, что вероятно отражает изменение их субъединичного состава и диссоциацию активаторов протеасом. В клетках исследованных нами организмов при инфицировании наблюдается возрастание химотрипсинподобной активности протеасом, которое ингибируется введением бортезомиба. Таким образом, изменения в тонкой структуре протеасом и активация шаперонов являются молекулярной основой для реактивности при инфицировании вирусами и патогенами у многоклеточных организмов.

Работа выполнена при частичной поддержке гранта РФФИ 16-04-00454.

КУПИРОВАНИЕ ПОВЕДЕНЧЕСКИХ ПАТТЕРНОВ ДЕПРЕССИВНО-ПОДОБНОГО СОСТОЯНИЯ У ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ ЖИВОТНЫХ ТРАНСПЛАНТАЦИЕЙ МОДУЛИРОВАННЫХ ПСИХОАКТИВНЫМ ВЕЩЕСТВОМ ИММУННЫХ КЛЕТОК

Маркова Е.В.¹, Княжева М.А.¹, Савкин И.В.¹, Тихонова М.А.², Амтиславская Т.Г.²

¹ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии», Новосибирск, Россия

²ФНГБУ «Научно-исследовательский институт физиологии и фундаментальной медицины», Новосибирск, Россия

Введение. Нарушение нейроиммунного взаимодействия является существенным звеном в патогенезе поведенческих расстройств, оказывая негативное влияние на их течение, утяжеляя клиническую картину, снижая эффективность терапии; в силу чего актуальным является поиск новых подходов к их лечению. Однонаправленное влияние большинства психоактивных препаратов на ЦНС и иммунную систему позволяет рассматривать иммунные клетки в качестве модельных объектов для воздействия на межсистемную функциональную взаимосвязь. Имеется достаточный массив данных о существенной роли иммунокомпетентных клеток и их биологически активных продуктов в патогенезе депрессии, что обуславливает возможность и перспективность иммунотерапии указанного состояния аутологичными иммунными клетками с модулированной экстракорпорально психоактивными веществами функциональной активностью. Ранее нами была показана возможность и механизмы стимуляции пассивного типа поведения у экспериментальных животных трансплантацией спленоцитов, с модулированной *in vitro* коффеином функциональной активностью.

Цель. Исследование влияния трансплантации иммунных клеток, функциональная активность которых была изменена предварительной экстракорпоральной обработкой коффеином, на поведенческие паттерны депрессивно-подобного состояния, индуцированного у экспериментальных животных длительным социальным стрессом.

Материалы и методы. В качестве доноров и реципиентов использовались мыши (СВАхС57BL/6)F1, в возрасте 3-х месяцев, с пассивным типом поведения в «открытом поле», у которых было сформировано депрессивно-подобное состояние методом сенсорного контакта с опытом 10-кратных ежедневных поражений в межсамцовых конфронтациях с доминирующим партнером. Иммунные клетки для трансплантации получали в стерильных условиях из суспензии спленоцитов, обрабатывали *in vitro* коффеином и внутривенно вводили сингенным реципиентам. В контрольной группе животных подготовка и трансплантация иммунных клеток проводилась в аналогичных условиях эксперимента, за исключением того, что последние культивировались без присутствия коффеина. У реципиентов через 48 часов после трансплантации оценивались параметры поведения в тесте «открытое поле», в тесте принудительного плавания по Порсолту, выраженность ангедонии, содержание ряда регуляторных цитокинов в патогенетически значимых для депрессивного состояния структурах головного мозга.

Результаты. Трансплантация иммунных клеток с модулированной коффеином функциональной активностью

вызывала у реципиентов в депрессивно-подобном состоянии стимуляцию двигательной и исследовательской активностей в «открытом поле»; существенное увеличение временных периодов мобильности в тесте принудительного плавания и снижение ангедонии, считающейся главным признаком депрессии в экспериментальных моделях, выявляемое по предпочтению потребления раствора сахарозы (в процентном отношении от общего количества потребляемой жидкости) по сравнению с контрольной группой животных ($87,8 \pm 2,0$ и $67,5 \pm 4,8$ соответственно; $p < 0,05$). Различия по указанным показателям между контрольной и опытной группами реципиентов регистрировались в течение 8-10 дней после клеточной трансплантации и были ассоциированы со стимуляцией нейрогенеза в гиппокампе. У животных в депрессивно-подобном состоянии после внутривенного введения иммунных клеток, обработанных *in vitro* кофеином, наблюдалось также изменение содержания ряда регуляторных цитокинов в патогенетически значимых для депрессивно-подобного состояния структурах головного мозга, преимущественно в сторону снижения провоспалительных цитокинов: в гиппокампе выявлено снижение IL-6, IFN γ и повышение IL-10; в гипоталамусе – снижение IL-1 β , IL-6, IFN γ ; в префронтальной коре – снижение IFN γ .

Заключение. Представленные результаты демонстрируют позитивный эффект трансплантации модулированных кофеином иммунных клеток, проявляющийся в купировании поведенческих паттернов депрессивно-подобного состояния у экспериментальных животных путем воздействия на патогенетические механизмы депрессии.

КОНЦЕНТРАЦИЯ ЦИТОКИНОВ В СЫВОРОТКЕ КРОВИ МАКАК-РЕЗУСОВ В СРАНИТЕЛЬНО ВОЗРАСТНОМ АСПЕКТЕ

Матуа А.З., Шевцова З.В., Трапш Х.З., Амаба С.Т.

Научно-исследовательский институт экспериментальной патологии и терапии АНА, Сухум, Абхазия

Введение. Обезьяны, как известно, являются наиболее адекватным экспериментальным объектом для решения задач экспериментальной биологии и медицины, вследствие биологического сходства с человеком (Лапин Б.А. и соавт., 1987, 2004; Фридман Э.П., 2009). Большинство видов приматов уже внесены в международную и национальные Красные книги (Лапин Б.А., 2004). Однако по-прежнему сохраняется необходимость изучения на приматах патогенеза инфекционных заболеваний, а также испытания на них вакцин и терапевтических препаратов при таких инфекциях, для которых нет альтернативных моделей. Учитывая, что цитокины являются одной из наиболее мощных систем регуляции и интеграции врожденных и адаптивных форм иммунного ответа, определение уровня ведущих цитокинов у соматически здоровых обезьян Сухумского питомника имело практическое значение.

Цели и задачи. Исследование уровня цитокинов у макак-резусов, с установлением нормативных значений для обезьян, содержащихся в условиях сухумского питом-

ника. Сравнение полученных концентрации цитокинов у молодых половозрелых обезьян (основная группа сравнения) с особями старшей возрастной группы и человеком.

Материалы и методы. Исследования проведены на базе Сухумского питомника при НИИ экспериментальной патологии и терапии АНА. Специалистами клинического отдела Сухумского питомника, по содействию клинико-лабораторным критериям соматического здоровья животных, были отобраны 60 здоровых макак-резусов (28♀ и 32♂). Группа 1 – 40 молодых половозрелых обезьян (с 4 до 11 лет) и группа 2 – 20 животных старшего возраста (с 20 до 30 лет). Забор крови осуществляли из локтевой вены в один и тот же временной промежуток – с 9 до 10 часов утра натощак. Методом иммуноферментного анализа, с применением тест-систем ЗАО «Вектор-Бест», были определены в сыворотке крови уровни следующих цитокинов: IL-1, IL-2, IL-4, IL-6, IFN γ .

Результаты. В сыворотке крови молодых половозрелых особей концентрация IL-1 β и IL-6 была ниже в 3,6 (IL-1 β) и в 1,5 (IL-6) раза по сравнению с животными старшей группы ($p < 0,0001$ и $p < 0,03$ соответственно). При этом содержание IL-2 и IFN γ у особей группы 1 было, наоборот, в 4,5 (IL-2) и 2,3 (IFN γ) раза выше по сравнению с группой 2 ($p < 0,0001$). Разницы в уровне IL-4 выявлено не было. При сравнении полученных данных с человеком, было определено, что концентрации цитокинов в сыворотке соматически здоровых макак-резусов молодого половозрелого возраста входит в диапазон нормативных значений цитокинов здоровых людей соответствующего возраста (Симбирцев А.С., 2009).

Заключение. Определение уровня ряда ведущих цитокинов и установление их норм явилось дополнительным иммунологическим критерием для полной оценки соматического здоровья макак-резусов Сухумского питомника. Кроме того то, что исследуемые цитокины укладываются в те же пределы нормативных колебаний, что и человеческие, является очередным подтверждением порой безальтернативного использования низших обезьян старого света при моделировании ряда иммунопатологических состояний.

ПОВРЕЖДЕНИЕ ОРГАНОВ ИММУНОПОЭЗА ПРИ ХИМИЧЕСКОЙ ТРАВМЕ И СПОСОБ ЕГО КОРРЕКЦИИ

Медведева С. Ю.^{1,2}, Пьянкова З.А.², Белоусова А.В.^{1,2}

¹ ФГБУН «Институт иммунологии и физиологии» УрО РАН, Екатеринбург, Россия

² ФГАОУ ВПО «Уральский федеральный университет им. первого Президента России Б.Н. Ельцина», Екатеринбург, Россия

Введение. Основной мишенью токсического действия тетрахлорметана (CCl $_4$) является печень. В последнее время много работ посвящено изучению структурных изменений печени, ее клеточных элементов, принимающих участие в регенерации при токсическом повреждении. Однако исследование иммунотоксикологического воздействия промышленных ядов на иммунные органы остается не до конца изученным и является актуальным, поскольку нарушение иммунологической реактивности может приводить к развитию инфекционных и онколо-

гических процессов, формированию аутоиммунных и аллергических реакций.

Цель. Выявить закономерности структурных изменений в органах иммуногенеза крыс при токсическом воздействии и фармакологической коррекции.

Задачи. Оценить структурные изменения в тимусе и селезенке крыс при токсическом воздействии и фармакологической коррекции; определить вклад Т- и В-лимфоцитов в процессы регенерации в органах иммунопоэза.

Материалы и методы. Эксперимент проведен на 25-ти крысах – самцах линии Wistar массой 180 ± 10 г в соответствии с принципами международных этических комитетов (Директива Совета ЕС 2010/63/EU) и одобрен этическим комитетом Института иммунологии и физиологии УрО РАН (протокол (No-D-ПМ-2015-28)). Все животные были разделены на экспериментальные группы: 1 группа – интактные животные, 2, 3 группа – внутрибрюшинное введение тетрахлорметана, 4 и 5 группы – на фоне моделирования токсического гепатита вводился иммуномодулятор макрофагов 3-аминофталгидразид (АФГ) по схеме. Выведение животных из эксперимента осуществлялось на 3 и 7 сутки.

Проводилось морфометрическое исследование препаратов тимуса и селезенки. Для иммуногистохимического (ИГХ) исследование тимуса и селезенки применяли моноклональные антитела mouse antirat CD3 clone G 4.18, CD45 RA clone OX-33. Количественную оценку Т- и В-лимфоцитов производили в единице площади в 20 полях зрения при увеличении микроскопа $\times 1000$.

Результаты. Введение СС14 на 3 и 7 сутки приводит к резкому угнетению иммуногенеза в селезенке, о чем свидетельствует достоверное сокращение площади белой пульпы и увеличение площади красной пульпы по сравнению с показателями у интактных животных. У экспериментальных животных наблюдается увеличение количества фолликулов на 3 и 7 сутки эксперимента по сравнению с интактными, однако средняя площадь фолликула снижается.

По данным морфометрии, в центральном органе иммунопоэза – тимусе, введение иммуномодулятора после токсического повреждения приводит к усилению лимфопоэза, что подтверждается достоверным увеличением площади коркового и мозгового вещества на 7 сутки эксперимента.

При ИГХ исследовании Т- и В-лимфоцитов установлено, что на 3 сутки токсического воздействия уменьшается количество Т-лимфоцитов в тимусе и В-лимфоцитов в селезенке. Уменьшение количества лимфоцитов в органах иммуногенеза при действии СС14 может быть связано с деструкцией лимфоцитов и подавлением метаболических процессов в клетках, резким и длительным подавлением пролиферации. Наряду с этим разрушение лимфоидной ткани при токсическом воздействии можно считать главной причиной уменьшения их количества. Применение АФГ приводило к увеличению количества иммуноцитов белой и красной пульпы селезенки, в тимусе зафиксировано увеличение численности преимущественно В-лимфоцитов, а количество Т-лимфоцитов на фоне введения иммуномодулятора на 7 сутки достигает значения близкого к интактным.

Заключение и выводы. Действие гепатотропного яда вызывает лимфопению, выражающуюся уменьшением Т- и В-лимфоцитов в органах иммунопоэза. Введение иммуномодулятора при токсическом повреждении усиливает лимфопоэз в тимусе и селезенке, что подтверждается увеличением числа Т- и В-лимфоцитов. Полученные результаты дают основание для применения иммуномодулятора АФГ в качестве перспективной стратегии в стимуляции репаративных процессов в органах иммунной системы после токсического воздействия.

Исследование проведено в рамках бюджетной программы «Изучение механизмов регенераторных процессов в органах и тканях с использованием экспериментальных моделей экстремальных факторов и токсического воздействия на организм», № гос. регистрации – 01201352042.

СПОНТАННАЯ И ИНДУЦИРОВАННАЯ ПРОДУКЦИЯ ЦИТОКИНОВ, СЕКРЕТИРУЕМЫХ КЛЕТКАМИ КРОВИ ОБЕЗЬЯН ВИДА МАКАК-РЕЗУС, ИММУНИЗИРОВАННЫХ КАНДИДАТНОЙ ЖИВОЙ РЕКОМБИНАНТНОЙ КОКЛЮШНОЙ ВАКЦИНОЙ (ДОКЛИНИЧЕСКОЕ ИЗУЧЕНИЕ)

Медкова А.Ю.¹, Амичба А.А.², Матуа А.З.²,
Синяшина Л.Н.¹, Шевцова З.В.², Семин Е.Г.¹,
Лядова И.А.¹, Цыганов Е.Н.¹, Конджария И.Г.²,
Баркая В.С.², Миквабиа З.Я.², Каратаев Г.И.¹

¹ ФГБУ «Федеральный научно-исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии» им. Н.Ф. Гамалеи
Министерства здравоохранения России, Москва, Россия

² Научно-исследовательский институт
экспериментальной патологии и терапии АНА, Сухум,
Абхазия

В последние десятилетия коклюш снова привлек к себе внимание в связи со вспышками заболевания даже в странах с подавляющей долей привитого населения. Это тяжелое инфекционное респираторное заболевание до сих пор остается одной из главных причин смертности младенцев в возрасте до 1 года. Из-за ослабления коллективного иммунитета, связанного с краткосрочной эффективностью применяемых вакцин, наблюдается адаптация возбудителя вследствие геномных изменений бактерий *B. pertussis*. Более того, поствакцинальный амнестический иммунный ответ (бустер-эффект) ослабевает и не поддерживается циркулирующими в настоящее время штаммами коклюшных бактерий. Такое развитие событий ставит вопрос о создании новых, более эффективных вакцин, способных обеспечивать поствакцинальную защиту от коклюша, сравнимую с постинфекционной.

Новая стратегия в достижении необходимого защитного иммунитета против коклюша заключается в создании препарата, максимально имитирующего природную инфекцию, но не проявляющую патогенных свойств вирулентных бактерий *B. pertussis*. В НИИЭМ им. Н.Ф. Гамалеи нами сконструированы рекомбинантные бактерии *B. pertussis*4MKS, продуцирующие нетоксичную иммуногенную форму коклюшного токсина – рКТ и не проявляющие активности непротективного антигена – дермонекротического токсина. На основе этих генетически аттенуированных бактерий – *B. pertussis*4MKS – разра-

ботана кандидатная рекомбинантная живая коклюшная вакцина (рЖКВ) для интраназального применения. Ранее нами было показано, что количество и сроки регистрации специфических антител в крови обезьян после иммунизации рЖКВ и экспериментального инфицирования вирулентными бактериями *B. pertussis*475 не коррелировали с показателями защитного противокклюшного иммунитета. Вероятно, именно клеточно-опосредованный иммунный ответ необходим для обеспечения длительной защиты от возбудителя коклюша и быстрого бустер-эффекта при контакте с возбудителем. Нами была изучена спонтанная и индуцированная продукция цитокинов клетками крови обезьян, как одна из достоверных характеристик местной защитной реакции и иммуномодулирующего эффекта от инвазии бактерий *B. pertussis*. Поскольку коклюш – это антропонозное заболевание, обезьяны представляются наиболее адекватной моделью. Иммунизация рЖКВ и экспериментальное инфицирование вирулентными бактериями *B. pertussis*475 обезьян вида макак-резус сопровождались однотипной цитокин-секреторной пролиферацией клеточного иммунного ответа по типу Th1/Th17 с формированием защитной реакции, препятствующей размножению возбудителя в носоглотке с ускоренными темпами его элиминации. Инфекционная провокация у иммунизированных обезьян рЖКВ сопровождалась выраженным бустерным эффектом. Сравнительная характеристика иммуномодулирующего действия рЖКВ и вирулентных бактерий *B. pertussis*475 подтвердила общие механизмы формирования долгосрочного защитного иммунитета.

КОМБИНИРОВАННАЯ ИММУНОМОДУЛИРУЮЩАЯ, АНТИОКСИДАНТНАЯ И МЕМБРАНОПРОТЕКТОРНАЯ ТЕРАПИЯ ПРИ РАЗЛИЧНЫХ ФОРМАХ ОСТРОГО ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО ПАНКРЕАТИТА

Микаелян П.К., Локтионов А.Л., Караулов А.В., Назаренко П.М., Тарасов О.Н.

Курский государственный медицинский университет, Курск, Россия

Введение. Экспериментальное изучение заболеваний и разработка методов лечения являются способом подтверждения существующих и предполагаемых гипотез и механизмов развития болезни, помогает обозначить точки приложения для эффективного воздействия фармакологической коррекции установленных нарушений в системах регуляции. Достаточно сложной в клиническом плане проблемой является острый панкреатит, имеющий несколько форм с большим количеством осложнений.

Цель и задачи. На экспериментальных моделях различных форм острого панкреатита оценить характер и степень иммунных нарушений, выявить корректирующие эффекты сочетания полиоксидоний, эмоксипин и эссенциале Н.

Материалы и методы. Эксперименты проведены на 118 здоровых половозрелых крысах Вистар, массой 150-200 г, с соблюдением всех правил работы с лабораторными животными. Моделирование острой отечной формы панкреатита (ООП) осуществляли путем дозированного криогенного воздействия жидкого азота на одну из долей поджелудочной железы. Острый деструктивный панкреа-

тит (ОДП) воспроизводили перевязкой протоков поджелудочной железы и трехкратной через 60 мин стимулирующей прозеринном в дозе 0,2 мг/кг. Животных с ООП и ОДП делили на 2 равные группы: без введения препаратов и с применением комбинации полиоксидония (0,03 мг внутримышечно через 24 часа, № 10), эмоксипина (1 мл 1% раствора разводили в 20 мл 0,9% раствора натрия хлорида; 0,5 мл готового раствора вводили внутримышечно, через 24 часа, № 10) и эссенциале Н (0,03 мл внутривенно через 24 часа, № 10). В качестве контроля использовали 15 животных без внешних признаков заболеваний. Формирование гуморального иммунного ответа (ГИО) оценивали на пятые сутки после иммунизации эритроцитами барана, подсчитывая в селезенке число иммунных антителообразующих клеток (АОК). Гиперчувствительность замедленного типа (ГЗТ) определяли по разнице масс регионарного и контрлатерального лимфатических узлов (РМ) и по разнице количества в них кариоцитов (РК) после введения разрешающей дозы антигена – эритроцитов барана. Фагоцитарная активность нейтрофилов циркулирующей крови оценивалась по фагоцитарному показателю (ФП), фагоцитарному числу (ФЧ) и индексу активности фагоцитоза (ИАФ). Кислородзависимую метаболическую активность полиморфно-ядерных лейкоцитов оценивали по НСТ-тестам спонтанному (НСТ-сп.) и стимулированному опсонизированным и неопсонизированным зимозаном (НСТ-ст. н/з, НСТ-ст. о/з), коэффициентам активации на опсонизированный и неопсонизированный зимозан и коэффициенту опсонизации (Кан, КАо, КО).

Результаты. В группе животных с ООП установлена супрессия формирования ГИО и ГЗТ (снижение всех исследованных показателей), снижение показателей фагоцитоза с одновременным повышением метаболической активности нейтрофилов периферической крови. У экспериментальных животных с ОДП выявлено более выраженное, по сравнению с отечной формой, снижение количества иммунных АОК в селезенке, РМ и РК регионарного и контрлатерального лимфатических узлов, фагоцитирующих кариоцитов и поглощенных ими частиц, повышение показателей, характеризующих кислородзависимую активность нейтрофилов на фоне снижения резервов гранулоцитов (КАн, КАо, КО). Применение при ООП комбинации полиоксидония, эмоксипина и эссенциале Н нормализовало формирование ГИО, ГЗТ и фагоцитарную активность нейтрофилов периферической крови и корректировало, но не до параметров контроля, их метаболическую активность. В условиях ОДП введение комбинации полиоксидония, эмоксипина и эссенциале Н нормализовало развитие ГИО, показатели фагоцитоза (ФП, ФЧ и ИАФ), корректировало, но не до уровня нормы, формирование ГЗТ (РК и РМ) и показатели кислородзависимой активности нейтрофилов циркулирующей крови.

Заключение. Таким образом, при отечной и деструктивной формах острого панкреатита развиваются различные по степени выраженности нарушения адаптивного и врожденного иммунитета, что, вероятно, связано с масштабом поражения тканей железы. Комбинированная иммуномодулирующая, мембранопротекторная и антиоксидантная терапия оказалась эффективной при деструктивной, в большей степени при отечной, форме

острого панкреатита, что обосновывает ее применение в клинике.

ЦИТОТОКСИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ НК-КЛЕТОК ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ В ОТНОШЕНИИ КЛЕТОК ТРОФОБЛАСТА

Михайлова В.А., Баженов Д.О., Хохлова Е.В., Сельков С.А., Соколов Д.И.

ФГБНУ «Научно-исследовательский институт акушерства и гинекологии им. Д.О. Отта», Санкт-Петербург, Россия

ГБОУ ВПО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург, Россия

Введение. НК-клетки, присутствующие в эндометрии матки, играют важную роль в процессе имплантации и в дальнейшем развитии плаценты. В течение пролиферативной фазы менструального цикла НК-клетки матки представляют собой небольшую популяцию клеток, однако их количество в эндометрии значительно возрастает в секреторную фазу цикла. После имплантации зародыша в ходе децидуализации в эндометрии матки появляется большое количество децидуальных НК-клеток, составляющих до 70% всех лейкоцитов, присутствующих в децидуальной оболочке и примерно 30% всех клеток децидуальной оболочки. Данные литературы указывают на возможность формирования популяции НК-клеток децидуальной оболочки из НК-клеток периферической крови. В настоящее время малоизученным остается вопрос об изменении цитотоксической функции НК-клеток при контакте с клетками трофобласта при беременности. Для определения цитотоксической активности НК-клеток наиболее распространенным является метод, в котором оценивается гибель клеток-мишеней перевиваемой линии K562 после культивирования с НК-клетками. Данная система *in vitro* не учитывает особенностей межклеточных взаимодействий, которые могут происходить в децидуальной оболочке и плаценте, что не позволяет полноценно оценить вклад НК-клеток в развитие беременности. Поэтому целью настоящей работы была разработка и апробация нового метода оценки цитотоксической функции НК-клеток.

Материалы и методы. В исследование включено 89 пациентов, среди которых было 54 здоровые небеременные женщины без предшествующих беременностей в анамнезе, 14 здоровых мужчин и 21 здоровая женщина с физиологически протекающей беременностью на сроке 6-7 недель.

НК-клетки периферической крови оценивали в составе моноклеаров, выделенных из периферической крови пациентов при помощи стандартного метода центрифугирования в градиенте плотности Histopaque®-1077 (Sigma, США). После выделения моноклеары периферической крови, содержащие НК-клетки, инкубировали в культуральной среде DMEM, содержащей 10% эмбриональной телячьей сыворотки (ЭТС), 100 Ед/мл пенициллина и 100 мкг/мл стрептомицина, 2 мМ L-глутамин, 10 мМ пирувата натрия в течение 4 суток в присутствии IL-2 («Ронколейкин», ООО «НПК Биотех») и без него. Затем моноклеары периферической крови в течение 4 часов инкубировали с клетками трофобласта линии Jeg-3, воспроизводящих основные морфологические, фено-

типические и функциональные характеристики инвазивного трофобласта первого триместра беременности. Часть клеток трофобласта инкубировали в аналогичной культуральной среде без добавления моноклеаров для определения базовой гибели клеток трофобласта. После этого оценивали количество нежизнеспособных клеток трофобласта. Полученные данные были статистически обработаны с помощью программы Statistica 10. Для сравнения полученных данных использовался U-критерий Манна-Уитни, являющийся непараметрическим аналогом t-критерия Стьюдента. Статистически значимыми признавались различия при $p < 0,05$.

Результаты. Установлено, что цитотоксическая активность НК-клеток в отношении клеток трофобласта была повышена в присутствии IL-2 по сравнению с цитотоксической активностью НК-клеток, инкубированных без IL-2, во всех обследованных группах пациентов. Группа здоровых небеременных женщин не отличалась от группы здоровых мужчин по цитотоксическому эффекту НК-клеток в отношении клеток трофобласта как в присутствии IL-2, так и без него. Цитотоксическая активность НК-клеток в отношении клеток трофобласта была снижена в группе женщин с физиологической беременностью на сроке 6-7 недель по сравнению с группой здоровых небеременных женщин как в присутствии IL-2, так и без него.

Заключение. Таким образом, способность НК-клеток периферической крови повышать цитотоксическую активность в присутствии активатора (IL-2) в используемой нами системе свидетельствует о возможности применения данной модели для оценки изменений функционального состояния НК-клеток. Установленные различия цитотоксической активности НК-клеток в отношении трофобласта в группах беременных и небеременных женщин, вероятно, связаны прошедшей успешной имплантацией при физиологической беременности, и возможными контактами НК-клеток данных пациенток с клетками трофобласта *in vivo*, что приводит к снижению цитотоксической активности НК-клеток и преобладанию их регуляторной функции.

ИНТЕРНАЛИЗАЦИЯ ПРОЛИН-БОГАТЫХ ПЕПТИДОВ ВРОЖДЕННОГО ИММУНИТЕТА В КЛЕТКИ ЧЕЛОВЕКА IN VITRO

Назаров А.С.^{1,2}, Кудрявцев И.В.¹, Филатенкова Т.А.¹, Копейкин П.М.¹, Баландин С.В.³, Овчинникова Т.В.³, Артамонов А.Ю.¹, Орлов Д.С.^{1,2}, Шамова О.В.^{1,2}

¹ ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины», Санкт-Петербург, Россия

² Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия

³ Институт биоорганической химии им. академиком М.М. Шемакина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва, Россия

Поиск соединений, обеспечивающих доставку лекарственных соединений в опухолевые клетки, является актуальной задачей биомедицинских исследований. Известно, что ряд пептидов, объединенных в группу Cell-Penetrating Peptides (CPP – проникающие в клетки пептиды), обладают способностью к интернализации в эукариотические клетки, а также могут переносить соединения различной природы через клеточные мембраны. Наиболее известные представители CPP – пенетратин,

ТАТ, пептид VP22 и др. В литературе имеются данные, что некоторые пептиды системы врожденного иммунитета, в частности антимикробные пептиды нейтрофильных гранулоцитов человека и животных, тоже обладают свойствами СРР и могут рассматриваться как перспективные прототипы средств доставки противоопухолевых соединений в неопластические клетки.

Цель. Изучение интернализации пролин-богатых пептидов, несущих флуоресцентную метку, в клетки человека в культуре. Объектом исследования служили синтетические аналоги пептидов семейства бактенецинов и их структурные модификации: минибактенецин miniChVac7.5Na, пептиды, представляющие собой фрагменты молекулы бактенецина ChVac5 – ChVac5 20-43 и ChVac5 7-22, бактенецин ChVac3.4 и его структурная модификация ChVac3.4-м. Для сравнения использовали пептид, относящийся к группе СРР – ТАТ (фрагмент капсидного белка вируса иммунодефицита человека, производства фирмы Sigma, США).

Материалы и методы. Исследуемые бактенецины получали путем твердофазного пептидного синтеза на приборе Symphony X (Protein Technologies, США). Осуществляли конъюгацию пептидов с флуоресцентным красителем BODIPY FL (Invitrogen, США), как описано (Шамова и соавт., 2007). Меченые пептиды очищали с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии. Проникновение меченых пептидов в клетки К-562 (эритромиелоидная лейкемия человека), ТНР-1 (моноцитарная лейкемия человека), мононуклеарные клетки периферической крови (МКПК) здоровых доноров *in vitro* количественно оценивали с помощью проточной цитофлуориметрии по увеличению величины сигнала зелёной флуоресценции (BODIPY FL, Ex/Em 503/512) на приборе Navios™ (Beckman Coulter, США).

Результаты. Меченые пептиды в концентрации 0,2 мкМ инкубировали с клетками (100 000 клеток в 100 мкл среды RPMI 1640) в течение 60 мин при 37 °С, затем клетки осаждали центрифугированием и отмывали от избытка несвязавшегося пептида, ресуспендировали в фосфатно-солевом буфере и анализировали на проточном цитофлуориметре. Перед измерением в пробы вносили раствор трипанового синего до конечной концентрации 40 мкг/мл, который служил в качестве «гасителя» флуоресценции BODIPY FL, так как, не проникая внутрь живых клеток, элиминировал сигнал от меченых пептидов, находящихся на поверхности клеток-мишеней. Установлено, что все исследуемые пептиды, несущие флуоресцентную метку, детектируются в клетках. Анализ показателей, характеризующих интенсивность флуоресценции, измеренной для трех типов клеток, обработанных пептидами, показал, что более эффективно все пептиды проникают в клетки К-562 и ТНР-1 по сравнению с МКПК здоровых доноров. Показатели, полученные для бактенецинов, были сравнимы или превышали таковые, полученные для пептида ТАТ (например, для пептида ChVac5 20-43 (0,2 мкМ) показатели интенсивности флуоресценции, выраженные в относительных единицах (отн. ед-цы), в случае клеток К-562 составили 10,1±2,32, клеток ТНР-1 – 65,3±13,4, МКПК – 5,76±2,2 отн. ед-ц; в то время как соответствующие показатели для пептида ТАТ (0,2 мкМ) составили 1,9±0,08, 4,1±1,2 и 1,26±0,07 отн. ед-ц). При этом наиболее выраженную способность проникать в исследуемые опухолевые клетки продемонстрировали пептиды ChVac5 20-43 и ChVac3.4-м.

Заключение. Полученные данные свидетельствуют о том, что исследуемые пролин-богатые пептиды обладают свойствами проникающих в клетки пептидов (СРР) и могут рассматриваться как прототипы соединений-переносчиков лекарственных средств в опухолевые клетки.

Работа поддержана грантом РФФИ № 17-04-02177а.

ВЛИЯНИЕ КОЛИЧЕСТВЕННОГО СОДЕРЖАНИЯ БАКТЕРИЙ НА ИММУНОТОКСИЧНОСТЬ ПРОБИОТИЧЕСКИХ ПРЕПАРАТОВ

Нежинская Г.И.¹, Ермоленко Е.И.^{1,2},
Евдокимова Н.Р.¹, Шабанов П.Г.¹, Даниленко В.Н.³,
Суворов А.Н.^{1,2}

¹ ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины»,
Санкт-Петербург, Россия

² Санкт-Петербургский государственный университет,
Санкт-Петербург, Россия

³ ФГБУ «Институт общей генетики
им. Н.И. Вавилова», Москва, Россия

Пробиотики, созданные на основе одного или нескольких штаммов бактерий (чаще всего лактобацилл, бифидобактерий и энтерококков) оказывают влияние на микробиоту и практически все системы организма. Иммуномодулирующее действие пробиотических препаратов является одним из наиболее значимых для терапии и профилактики различных заболеваний, затрагивающих пищеварительную, нервную эндокринную и сердечно-сосудистую системы. Однако до сих пор остается малоизученной иммунотоксичность рассматриваемых препаратов.

Целью исследования являлось определение летальной дозы и иммунотоксического действия различных доз препарата М, включающего смесь пробиотических штаммов *Enterococcus faecium* L3, *Lactobacillus rhamnosus* K32, *Bifidobacterium longum* GT15 в реакциях гиперчувствительности замедленного типа (ГЗТ), антилеообразования в селезенке (АОК) и оценки активности перитонеальных макрофагов. В работе использовали мышей-самцов линии BALB/c (n = 90) и беспородных белых мышей (n = 120). Исследование разрабатываемой лекарственной формы М на острую токсичность показало, что LD50 составляет 2×10^9 КОЕ/мышь, а терапевтическая доза ($1/100$ LD50) – 2×10^7 КОЕ/мышь. В связи с данными результатами при исследовании иммунотоксичности были взяты дозы – 2×10^7 и 2×10^8 КОЕ/мышь. Препарат М вводили внутривентрикулярно в соответствии с предполагаемым способом его применения в клинике (*per os*). Контрольные животные получали по 0,3 мл плацебо (0,9%-ный раствор NaCl). В качестве препарата сравнения использовали Линекс (Lek®, Словения), содержащий *L. acidophilus*, *B. infantis*, *E. faecium* в дозе 5×10^7 КОЕ/мышь. Изучение влияния М на иммунитет было проведено в соответствии с ранее предложенными рекомендациями (Миронов А.Н. и соавт., 2013). Было показано, что пробиотик М в высокой дозе (2×10^8 КОЕ/мышь), но не в терапевтической, увеличивал (через 3, 6 и 24 ч) интенсивность ГЗТ, по сравнению с контролем (введением эритроцитов барана, $p < 0,001$, n = 10). Применение терапевтической дозы М стимулировало образование АОК в селезенке мышей ($p < 0,05$, n = 10), а использование высокой дозы существенно супрессировало его ($p < 0,001$, n = 10). Оценка модуляции ответа АОК при введении М и Линекса с оче-

видностью демонстрировало, что индекс модуляции при применении М в дозе 10^8 КОЕ/мышь и Линекса 5×10^7 КОЕ/мышь определялся со знаком «—», свидетельствуя о токсическом действии этих препаратов и необходимости ограничения их дозы. В отношении действия на фагоцитоз макрофагов, подтверждалось, что М в дозе 2×10^7 КОЕ/мышь, эффективно увеличивает концентрацию макрофагов в перитонеальном экссудате и их поглощательную активность ($p < 0,001$). Показано, что М в дозе 10^7 М существенно превосходил влияние Линекса на фагоцитарную активность макрофагов ($p < 0,001$). Однако высокая доза (2×10^8 КОЕ/мышь) М приводило к снижению фагоцитарного индекса.

Таким образом, разрабатываемый препарат М, в состав которого входят штаммы *E. faecium* L3, *L. rhamnosus* K32, *B. longum* GT15, в дозе 10^7 КОЕ/мышь, не нарушает функционирование иммунной системы, а по стимуляции фагоцитарной активности превосходит Линекс. При включении пробиотиков в схемы таргетной терапии различных заболеваний нужно учитывать, что дозы препаратов могут существенно влиять на реализации важных функции иммунной системы.

ВОЗДЕЙСТВИЕ ПРЕПАРАТА ФОСПРЕНИЛ НА ПОЛЯРИЗАЦИЮ ИММУННОГО ОТВЕТА, ОБУСЛОВЛЕННУЮ *CagA*⁺ ФРАГМЕНТОМ ХРОМОСОМЫ *HELICOBACTER PYLORI*

**Николаева Т.Н., Козлов В.В., Григорьева Е.А.,
Белый Ю.Ф., Пронин А.В.**

*ФГБУ «Федеральный научно-исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф. Гамалеи»
Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия*

Иммунные механизмы являются ключевыми в формировании *Helicobacter pylori* (H.p), ассоциированной гастродуоденальной патологии.

Функциональные белки *CagA* М.М.120-145-kDa, кодируемые островком патогенности *cagA(cagPAI)* в 40kb, интегрированным в хромосому *H.p.*, воздействуют на множественные сигнальные пути, которые регулируют естественный клеточный иммунитет, в том числе Th-клетки. С *CagA* ассоциировано смещение поляризации иммунного ответа с Th1 на Th2 с параллельным возрастанием активности регуляторных Т-клеток и прогрессией тяжелых форм поражения желудка вплоть до аденокарциномы. При инфекции, вызванной *CagA⁻ H.p.*, такого смещения не наблюдается.

В связи с этим актуален поиск путей иммунокоррекции естественного и адаптивного иммунитета при хеликобактериозе. Фоспренил (ФП) относится к фосфорилированным полиизопреноидам, которые являются интегральными компонентами мембран всех живых клеток, где выполняют функции промежуточных акцепторов сахаров (в частности маннозы) при биосинтезе гликопротеинов. Ранее было показано, что препарат способен подавлять взаимодействие IL-2 с CD25 и, таким образом, препятствовать активации регуляторных Т-клеток. В связи с этим целью настоящего исследования состояла в изучении действия препарата ФП на иммунный ответ экспериментальных животных, инфицированных живыми бактериями генетически родственных штаммов *E. coli* BL21, отличающихся наличием островка *cagA H.pylori*.

Материалы и методы. бактерии генетически родственных штаммов живых бактерий *E. coli* BL21p119(*CagA*⁺) и *E. coli* BL21pET-28c (*CagA*⁻). Мышам интрагастрально через металлический зонд вводили живые бактерии изученных штаммов в количестве 5×10^9 КОЕ/0,5 мл. Клеточные иммунные реакции оценивали по уровню пролиферации спленоцитов в реакции бласттрансформации (РБТЛ), цитотоксической активности ЕК-клеток селезенки, синтезу цитокинов методом ELISA. Анализ экспрессии поверхностных антигенов на мононуклеарных лимфоцитах селезенки проводили методом проточной цитофлуориметрии с использованием моноклональных антител анти-CD3-FITC, CD4-PE-Cy7, CD8-APC (BD Biosciences, USA). Образцы анализировали на проточном цитофлуориметре BD FACS CantoII (BD Biosciences, USA).

Результаты. Введение животным *E. coli CagA*⁺ уже через сутки сопровождается резким усилением пролиферативной активности спленоцитов, чего не наблюдается после заражения изогенным *CagA*⁻ штаммом *E. coli* BL21. Предварительное введение животным ФП за 3 часа до заражения нивелирует различия между штаммами. При этом ФП усиливал активацию естественных киллеров у мышей, зараженных штаммом *E. coli* BL21p119 (*CagA*⁺), значительно сильнее, чем у животных зараженных штаммом, не продуцирующим *CagA* белки ($P < 0,05$).

Методом проточной цитофлуориметрии показано, что ФП сильнее снижает число CD3⁺CD4⁺T клеток у мышей, инфицированных *CagA*⁺ по сравнению с мышами, инфицированными *CagA*⁻ мутантом и подавляет продукцию IL-2 Т-клетками, оставляя неизменным соотношение IFN γ , IL-4 и IL-10, что свидетельствует об ингибирующем воздействии ФП на регуляторные Т-клетки.

Таким образом, ФП, подавляя активность регуляторных Т-клеток, может препятствовать поляризации иммунного ответа с Th1 на Th2, связанной с активностью *CagA*.

ЭФФЕКТЫ ДЕЙСТВИЯ АНТИМИКРОБНЫХ ПЕПТИДОВ НА ЦИТОТОКСИЧЕСКУЮ АКТИВНОСТЬ МОНОНУКЛЕАРОВ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА В ОТНОШЕНИИ КЛЕТОК МНОЖЕСТВЕННОЙ МИЕЛОМЫ *IN VITRO*

**Пазина Т.Ю.¹, Артамонов А.Ю.¹, Орлов Д.С.^{1,2},
Филатенкова Т.А., Шамова О.В.^{1,2}**

*¹ ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины»,
Санкт-Петербург, Россия*

*² Санкт-Петербургский государственный университет,
Санкт-Петербург, Россия*

Нейтрофилы, циркулирующие в периферической крови и мигрирующие в очаги развития патологических процессов, способны посредством биологических активных молекул модулировать иммунный ответ, а именно влиять на функцию цитотоксических Т- и ЕК-клеток. Роль нейтрофильных гранулоцитов в опухолеобразовании неоднозначна, так как секретируемые этими клетками факторы могут, как стимулировать опухолевый рост, так и способствовать его ограничению. Известно, что катионные пептиды (АМП) нейтрофилов, проявляющие антимикробные свойства, обладают также и противоопухолевой активностью.

Целью исследования явилась оценка влияния пептидов системы врожденного иммунитета альфа-дефенсина человека HNP-1, кателицидина человека LL-37, бета-дефенсина человека hDB-3, а также двух АМП животных: протегрин 1 (PG-1) и бактенецина ChVac.3.4 на цитотоксическое действие ЕК- и Т-клеток фракции мононуклеаров периферической крови здоровых доноров в отношении клеточных линий множественной миеломы (ММ): ММ.1R и RPMI8226, *in vitro*.

Цитотоксическую активность ЕК-клеток фракции мононуклеаров здоровых доноров определяли по их способности лизировать клетки-мишени RPMI-8226 и ММ.1R *in vitro*, при помощи набора реактивов Delfia EuTDA Cytotoxicity Reagents kit (PerkinElmer, США). Пептиды применяли в концентрации, при которой они, по результатам МТТ-теста, не проявляют токсичности для клеток-мишеней и эффекторов: PG-1 – 2 мкМ, LL-37 – 5 мкМ, HNP-1 – 10 мкМ, hDB-3 – 1 мкМ, ChVac.3.4 – 5 мкМ. Лизис клеток-мишеней количественно оценивали, проводя измерения в режиме отсроченной во времени флуоресценции (TRF) на приборе Omega Polar Star (BMG Labtech, Германия). Результаты рассчитывали в процентах по формуле: % лизиса = (экспериментальное значение – контроль (0% лизиса))/(контроль (100% лизиса) – контроль (0% лизиса)).

В большинстве случаев установлено увеличение лизиса целевых клеток в присутствии мононуклеаров и пептидов по сравнению с контрольными пробами, где клетки инкубировались только в присутствии мононуклеаров или только пептидов. Действие LL-37 – пептида, который содержится преимущественно в нейтрофилах или в клетках барьерных эпителиев человека, наиболее выражено для всех исследованных клеточных линий. Интересно, что данным эффектом обладал, как мембранолитический пептид PG-1, имеющий конформацию бета-шпильки, так и линейный пролин-богатый бактенецин ChVac.3.4, для которого описано менее выраженное повреждающее действие в отношении клеточных мембран. Бета-дефенсин человека hBD3, который проявил наиболее высокую собственную цитотоксическую активность в отношении клеток ММ *in vitro*, оказывал наименьший эффект на цитотоксическое действие мононуклеарных клеток в данных экспериментальных условиях.

Полученные данные свидетельствуют в пользу предположения о возможном участии АМП в противоопухолевой защите, не только вследствие их прямого цитотоксического действия на малигнизированные клетки, но и за счет их взаимодействия с ЕК- и Т-клетками.

Работа поддержана грантом РФФИ № 17-04-02177а.

ВЛИЯНИЕ ОКСИТОЦИНА НА СОСТАВ ЛЕЙКОЦИТОВ В МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЕ У ЛАКТИРУЮЩИХ КРЫС

Панова Н.А., Скопичев В.Г.

Санкт-Петербургская государственная академия ветеринарной медицины, Санкт-Петербург, Россия

Введение. Лактационные процессы в молочной железе тесно связаны с деятельностью иммунной системы. Эта взаимосвязь может проявляться в непосредственной регуляции секретобразования. В результате, отдельные иммунокомпетентные клетки мигрируют в просвет альвеол и включаются в состав секрета молозива и молока. Синтез молока и молозива молочной железой, а также проницаемость гемато-молочного барьера, являются

важными составляющими для дальнейшего роста и развития потомства. В первые дни жизни молозиво играет исключительную роль в поддержании иммунной системы новорожденного, так как содержит необходимые для него иммуноглобулины. Помимо антител, с секретом молочных желез, в организм детёныша поступают лейкоциты, которые проникают через гемато-молочный барьер и являются клеточными факторами защиты. В молоке постоянно присутствуют лимфоидные клетки, количество которых значительно изменяется под влиянием окситоцина на рецепторы миоэпителиальных клеток. Раздражение механорецепторов молочной железы стимулирует выделение нейрогипофизом в кровь окситоцина, который непосредственно стимулирует молокоотдачу из альвеол.

В настоящее время влияние клеточного и гуморального иммунитета на молочную железу самок, в период лактации, изучен недостаточно. Вместе с тем проблемы клеточного иммунитета, приобретаемого потомством с молозивом и молоком, являются актуальными и насущными.

Цель и задачи. Изучение количественного состава лейкоцитов в мазках-отпечатках молочной железы лактирующих крыс до влияния окситоцина и через 5 и 10 минут после введения гормона нейрогипофиза.

Материалы и методы. Экспериментальная часть выполнена на безлинейных лактирующих крысах. Сформировали 3 группы крыс по 5 животных в каждой. Продолжительность лактации в контрольной и опытных группах, на момент исследования, составляла 1 неделю. Крысам опытных групп вводили внутривенно окситоцин в дозе 0,1 мл. У крыс всех групп выделяли молочные железы. В опытных – через 5 и 10 минут. Делали продольный разрез и на предметных стеклах готовили мазки-отпечатки. Готовые, высушенные мазки окрашивали по Паппенгейму и проводили подсчет иммунокомпетентных клеток при помощи иммерсионной оптики.

Результаты. Анализ полученных нами данных показал, что иммунокомпетентные клетки присутствуют во всех мазках-отпечатках. В молочной железе контрольной группы установлено незначительное количество отдельных видов лейкоцитов. В опытных группах, под влиянием окситоцина, существенно изменился количественный и качественный состав лейкоцитов.

Раздражение рецепторов миоэпителиальных клеток молочной железы окситоцином через 5 минут стимулировало значительное повышение количества лимфоцитов, по сравнению с контрольной группой, с 15 до 35 и к 10-й минуте снизилось до 6 клеток. В молочных железах находились большие, малые, средние и делящиеся лимфоциты. В мазках-отпечатках присутствовали палочкоядерные, сегментоядерные нейтрофилов и моноциты. Но их количественный состав менялся незначительно. При микроскопическом исследовании мазков-отпечатков молочной железы встречались жировые и эпителиальные клетки.

Заключение. В непосредственном контакте с секреторными и миоэпителиальными клетками альвеол находятся такие клеточные компоненты соединительной ткани как тучные клетки и лейкоциты, оказывающие влияние на деятельность клеток альвеол. Барьер «кровь-молоко» способны преодолевать только мигрирующие, активированные лейкоциты. Не активированные лейкоциты локализуются в эпителиальных тканях и выполняют функции иммунологической защиты.

Повышение содержания лейкоцитов в молочной железе, после стимуляции окситоцином, происходило за счет увеличения числа лимфоцитов. Проникновение их из крови в молочную железу и изменение гемато-молочного барьера связано с действием окситоцина.

Во время лактации механизмы иммунной системы самки максимально направлены на защиту потомства и поддержание его иммунного статуса в первые дни жизни. Происходит этот процесс под непосредственным контролем нейрогуморальной регуляции. С молозивом и молоком новорожденный получает все питательные вещества и иммуноглобулины, необходимые для роста и развития организма. Но данные защитные факторы быстро элиминируются.

На основе наших исследований можно предположить, что клеточные факторы защиты являются составляющими колострального иммунитета, в результате которого у новорожденного обеспечивается стойкий и длительный иммунитет.

ОЦЕНКА ХРОНОСОПРЯЖЕННОСТИ ИЗМЕНЕНИЙ ПЛОТНОСТИ ПРОСТРАНСТВЕННОГО РАСПРЕДЕЛЕНИЯ ТКАНЕВЫХ БАЗОФИЛОВ И МОРФОФУНКЦИОНАЛЬНЫХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ ЩИТОВИДНОЙ ЖЕЛЕЗЫ В ПОСЛЕРОДОВОМ ПЕРИОДЕ

Параскун А.А., Виноградов С.Ю., Штойко М.А., Чериков В.С.

ФГБОУ ВО «Ивановская государственная медицинская академия» Министерства здравоохранения РФ, Иваново, Россия

По данным популяционных исследований, в последние годы увеличивается распространенность заболеваний щитовидной железы у женщин во время беременности и лактации. В поддержании внутриорганного гомеостаза щитовидной железы принимают участие тканевые базофилы, которые накапливают и выделяют широкий спектр биологически активных веществ, тем самым регулируя пролиферацию клеток, их дифференцировку, функциональную активность и межклеточные взаимодействия. **Цель** исследований — оценка хроносопряженности динамики плотности пространственного распределения тканевых базофилов (ТБ) и морфофункциональных параметров щитовидной железы (ЩЖ) в послеродовом периоде. Работа выполнена на 40 беспородных крысах-самках. Сроки эксперимента составили — 0, 1, 3, 5, 7, сутки после родов и лактации. Исследования с животными проводили в соответствии с «Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных». После забоя у крыс отделяли обе доли ЩЖ. Одна доля подвергалась криостатному микротомированию, а другая — парафиновой проводке. Для оценки плотности пространственного распределения ТБ срезы окрашивали альциановым синим-сафранином в прописи J. Desaga и изучали с помощью микроскопа Биолам (об. 90, ок.10). Подсчитывали количество тканевых базофилов в поле зрения (10 полей зрения — 1 варианта статистического массива). При анализе результатов тучные клетки были разделены на основе сродства гранул к красителям на 3 группы: альцианофильные, миксные, сафранинофильные. Морфометрические исследования препаратов, окрашенных гематоксилин-эозином, проводили с помощью анализатора изображений, используя программу ВИДЕО ТЕСТ

МАСТЕР. Содержание тироксина (Т4), трийодтиронина (Т3), тиреотропного гормона (ТТГ) в сыворотке крови животных определяли методом ИФА. Статистическая обработка материала проводилась с использованием программ Microsoft Excel 2010, Statistica 6.0. Для выявления и анализа внутри- и межрегиональных сопряжений изменения оценочных параметров применялся непараметрический метод рангового корреляционного анализа Спирмена. В результате исследований изучена 361 ранговая корреляционная зависимость, из них 152 отражают колебания показателей с ТБ (28% достоверных). Динамике хроносопряжений ТБ между собой оценивают 37%, а с морфофункциональными параметрами ЩЖ 63%. Блок наиболее тесных зависимостей выявлен между общим количеством ТБ и показателями ЩЖ (32%): отрицательные («-») — с высотой тироцитов, площадью фолликулов; положительные («+») — с индексом накопления коллоида, содержанием ТТГ в сыворотке крови. В центральных зонах ЩЖ большим количеством значимых связей обладает изменение сафранинофильных ТБ («-» с высотой тироцитов, площадью фолликулов; «+» с уровнем Т3), в периферических участках железы — миксных ТБ («+» с индексом накопления коллоида и его оптической плотностью, содержанием Т4). Таким образом, корреляционный анализ демонстрирует хроносопряженность динамики плотности распределения ТБ и показателей функциональной активности ЩЖ.

ВЛИЯНИЕ ПСИХОЭМОЦИОНАЛЬНОГО СОСТОЯНИЯ НА МЕТАСТАЗИРОВАНИЕ АДЕНОКАРЦИНОМЫ ЛЬЮИС У МЫШЕЙ

Попова Н.А.^{1,2}, Каледин В.И.², Николин В.П.², Амикишиева А.В.², Ильницкая С.И.²

¹ Новосибирский национальный исследовательский государственный университет, Новосибирск, Россия

² ФИЦ «Институт цитологии и генетики» СО РАН, Новосибирск, Россия

Исследование условий и особенностей метастазирования злокачественных опухолей представляется весьма актуальным, поскольку именно метастазы опухолей являются непосредственной причиной смертельных исходов онкологических заболеваний.

Не вызывает сомнений, что хронический стресс и сопровождающая его общая напряженность, которая перерастает в чувство повышенной тревожности и далее в депрессию, оказывает влияние на рост и метастазирование злокачественных опухолей. Механизм этого феномена может реализоваться путем индукции психоэмоционального иммунодефицита. Ранее нами показано, что хронический стресс в виде 20-дневных ежедневных социальных конфронтаций в одинаковой степени усиливает рост аденокарциномы Льюис как у победителей в межсамцовых столкновениях, так и у побежденных. Однако число метастазов в легких при этом увеличивается только у побежденных. В использованной нами модели социальных конфликтов побежденные самцы имеют последствия ежедневных драк в виде повреждений кожи, что очевидно вызывает воспаление, которое в свою очередь может стать причиной иммунодефицита. Чтобы исключить эту возможность, мы изучали зависимость метастазирования от психоэмоционального статуса на поведенческой модели, в которой формирование соответствующего статуса про-

исходит без физических повреждений. Использовали непредсказуемый мягкий стресс (НМС) включающий наклон клетки, лишение пищи или воды до 12 часов, ограничение подвижности на 1 час, тряска в вибрирующей установке 1 час, изъятие подстилки или мокрая подстилка. Ранее показано, что такой стресс провоцирует развитие депрессивноподобного статуса у мышей и крыс. В результате было показано, что у мышей подвергшихся НМС, число метастазов опухоли Льюиса в легких увеличено в 2 раза, по сравнению с контролем. Таким образом, сдвиг психоэмоционального состояния в негативную сторону оказывает влияние на процесс метастазирования. Это надо учитывать при ведении онкологических больных в клинике.

РОЛЬ ТРОФОБЛАСТИЧЕСКОГО β -ГЛИКОПРОТЕИНА В РЕГУЛЯЦИИ ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ Т-КЛЕТОК ИММУННОЙ ПАМЯТИ

Раев М.Б.^{1,3}, Литвинова Л.С.², Юрова К.А.², Дунец Н.А.², Хазиахматова О.Г.², Тимганова В.П.¹, Бочкова М.С.¹, Храпцов П.В.^{1,3}, Заморина С.А.^{1,3}

¹ ФГБУН «Институт экологии и генетики микроорганизмов» УрО РАН, Пермь, Россия

² ФГАОУ ВО «Балтийский федеральный университет им. И. Канта», Калининград, Россия

³ ФГБОУ ВПО «Пермский государственный национальный исследовательский университет», Пермь, Россия

Трофобластический β 1-гликопротеин (ТБГ) является одним из наиболее информативных маркеров формирования и функционирования фетоплацентарной системы. Невзирая на очевидный иммунорегуляторный потенциал ТБГ, его роль в регуляции Т-клеток иммунной памяти остается неизвестной. В то же время, присутствие фетоплацентарных антигенов в период беременности, модулирует Т-клеточную память, что имеет значение для формирования иммунной толерантности, а также для последующей беременности (Keiffer T.E. et al., 2016). Можно предположить, что ТБГ регулирует функциональную активность циркулирующего пула Т-клеток памяти, потенциально способных к осуществлению антиген-специфических цитотоксических реакций в отношении антигенов эмбрионального происхождения.

Цель. Оценка роли ТБГ в регуляции экспрессии маркеров активации (CD25, CD28, CD71) и продукции ИЛ-2 изолированной субпопуляцией Т-клеток памяти в системе *in vitro*.

Материалы и методы. Аутентичный нативный ТБГ человека получали авторским методом (Патент РФ № 2367449, Раев М.Б.). Монокультуры Т-клеток памяти (CD45RO⁺) получали методом иммуномагнитной сепарации с использованием технологии MACS® («Miltenyi Biotec», Германия) из суспензии МПК здоровых доноров (n = 8). Выделенные клетки с фенотипом CD45RO⁺ (1 × 10⁶ кл/мл) культивировали в 48-луночных планшетах в полной питательной среде в течение 48 ч при 37 °С, 5% CO₂. В качестве активатора Т-лимфоцитов использовали Т-Cell Activation/Expansion Kit human (анти-CD2/CD3/CD28 комплекс) (Miltenyi Biotec, Германия). Определение поверхностных молекул костимуляции и активации (CD71 FITC, CD8 PE, CD25 PE-Cy 5.5, CD28PE Cy7, CD4 APC, Miltenyi Biotec, Германия) на CD45RO⁺Т-клетках проводили на проточном цитофлуо-

риметре MACS Quant (Miltenyi Biotec, Германия). Содержание ИЛ-2 в культуральных супернатантах оценивали иммуноферментным методом при помощи тест-систем «Вектор-Бест» (Россия). Статистическая обработка данных проводилась с помощью парного *t*-критерия Стьюдента.

Результаты. Первым этапом анализа данных стала оценка дифференцировки Т-клеток памяти (CD45RO⁺) по субпопуляциям CD4⁺ и CD8⁺. Установлено, что изолированные CD45RA-клетки в контрольных пробах имели следующее соотношение: CD4⁺ 68,12±4,11; CD8⁺ 25,95±5,32; CD4⁺CD8⁺ 0,549±0,161. Установлено, что ТБГ (10, 100 мкг/мл) снижал экспрессию CD25 в гейте CD45RO⁺CD4⁺ лимфоцитов, активированных анти-CD2/CD3/CD28 комплексом, но не влиял на экспрессию CD28 и CD71 этими клетками. Как известно, CD25 (α -цепь рецептора для ИЛ-2) представляет собой маркер активации и тесно связан с продукцией ИЛ-2. Одновременно ТБГ стимулировал аутокринную продукцию ИЛ-2 CD45RO⁺ клетками, но это не приводило к усилению экспрессии CD25. ИЛ-2 необходим для развития Т-регуляторных лимфоцитов, увеличение количества которых ассоциировано с успешной беременностью (Shumacher A et al., 2009) и, возможно, именно они являются «мишенью» для ИЛ-2, продуцируемого CD45RO-клетками под воздействием ТБГ. Важно отметить, что депрессивные эффекты ТБГ реализовались только на уровне CD4⁺ лимфоцитов, не затрагивая субпопуляцию CD8⁺, что согласуется с данными Keiffer T.E. (2016).

Таким образом, впервые установлена роль ТБГ в регуляции активности Т-клеток иммунной памяти, ассоциированная с подавлением экспрессии активационного маркера CD25 и стимуляцией продукции этими клетками ИЛ-2. Полученные данные расширяют представления о роли ТБГ в формировании иммунной толерантности в период беременности.

Исследование поддержано грантом РФФИ 16-44-0049 и программой повышения конкурентноспособности («дорожной карты») и субсидии «Организация проведения научных исследований 20.4986.2017/ВУ» БФУ им. И. Канта.

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ГЛИКАН-СВЯЗЫВАЮЩЕГО ПАТТЕРНА ДЕНДРИТНЫХ КЛЕТОК МЫШИ И ЧЕЛОВЕКА

Рапопорт Е.М., Моисеева Е.В., Хайдуков С.В., Аронов Д.А., Пазынина Г.В., Цыганкова С.В., Бовин Н.В.

ФГБУН «Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова» РАН, Москва, Россия

Введение. В последнее время все большее значение приобретают исследования по созданию универсальных вакцин, направленных на активацию дендритных клеток (ДК). Особенно привлекательно использовать ДК в качестве мишеней в вакцинах для терапии инфекционных заболеваний, вызванных бактериями и вирусами, которые характеризуются высокой генетической изменчивостью. У вирусов и бактерий ДК распознают патоген-ассоциированные молекулярные структуры (ПАМС). Дополнительная нагрузка вакцин лигандами лектинов, связывающие последних с соответствующими ПАМС может при-

вести к активации эндцитоза ДК чужеродного антигена (Lepenies et al., 2013; van Kooyk et al., 2013).

Недавно мы провели картирование клеток крови человека с помощью библиотеки флуоресцеин-меченых полиакриламидных гликоконъюгатов (гликопроб), синтезированных в Лаборатории углеводов ИБХ РАН. Из 230 исследованных гликопроб было выбрано восемь, с которыми связывалось более 15% популяции лейкоцитов крови человека, содержащей циркулирующие дендритные клетки (цДК) и «неклассические» моноциты (нМо). Дальнейшее исследование показало, что нМо связываются с 4'-O-Su-GalNAcb1-4GlcNAcb (4'-O-Su-LacdiNAc), цДК — с Man-содержащими гликанами: Mana1-3(Mana1-6)Manb (Man)₃, (Galb1-4GlcNAcb1-2Mana)₃, 6-Manb1-4GlcNAcb1-4GlcNAcb и Mana1-3(Mana1-6)Manb1-4GlcNAcb1-4GlcNAcb, а также с трисиалозидом (Neu5Aca-8)₃ и дисахаридом GalNAca1-3Galb (A_{di}) (Rapoport et al., 2017). Анализ данных о локализации и специфичности лектинов позволил нам предположить, что мишенями выбранных гликанов в составе вакцин могут быть макрофагальный галактозосвязывающий лектин, MGL (A_{di}), сиглек-7 ((Neu5Aca2-8)₃) и дектин-2 (Man-содержащие гликаны). Мы полагаем, что эти гликаны могут быть использованы в качестве дополнительных векторов для улучшения доставки вакцины к ДК.

В экспериментах *in vivo* терапевтическое действие вакцин часто исследуется на мышинных моделях. В связи с этим целью данной работы было провести сравнительный анализ гликан-связывающего профиля популяции, содержащей цДК и нМо, в крови человека и мыши.

Методы. Сначала, используя боковое светорассеяние (SSC) и экспрессию CD45 на лейкоцитах, в периферической крови мыши были гейтированы моноциты, затем была локализована популяция клеток, экспрессирующая CD14^{low-to-neg}CD80⁺CD16⁺, содержащая цДК и нМо. Далее исследовалось связывание этих клеток с гликопробами, которые были выбраны нами при скрининге этой же популяции в крови человека (van Kooyk et al., 2013).

Результаты. 1) Из восьми гликопроб, с которыми связывалось более 15% популяции цДК+нМо человека, для четырех уровни связывания цДК+нМо мыши были тоже высокие, а именно для A_{di}.

Mana1-3(Mana1-6)Manb1-4GlcNAcb1-4GlcNAcb, (Neu5Aca-8)₃ и 4'-O-Su-LacdiNAc, с последним связываются нМо, а не цДК (Rapoport et al., 2017). 2) Наиболее высокий уровень связывания (более 50%) популяции цДК+нМо человека выявлен с гликопробой A_{di}, цДК+нМо мыши связывались с этой гликопробой слабее. По-видимому, это объясняется различной углеводной специфичностью MGL человека и его мышинных гомологов MGL1 и MGL2.

Заключение. Гликан-связывающий профиль мыши и человека не идентичен, что должно учитываться при исследовании механизмов терапевтического действия вакцины, содержащей гликановый вектор, на мышах *in vivo*.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований — № 16-04-01084 и гранта UniVaxA “Universal influenza vaccine through synthetic dendritic cell-targeted self-replicating RNA vaccines” (№ 601738).

РЕГУЛЯТОРНЫЕ КЛЕТКИ В КОНТРОЛЕ ИММУННОГО ОТВЕТА И ВОСПАЛИТЕЛЬНОГО ПРОЦЕССА В ЛЕГКИХ ПРИ ТУБЕРКУЛЕЗЕ

Рубакова Э.И., Капина М.А., Логунова Н.Н., Майоров К.Б., Апт А.С.

ФГБНУ «Центральный научно-исследовательский институт туберкулеза», Москва, Россия

Считается, что Т-лимфоциты CD4⁺, вырабатывающие IFN γ , и интерстициальные легочные макрофаги, активированные этим цитокином, играют главную роль в защите от хронической туберкулезной инфекции (ТБ), которая развивается в тех случаях, когда факторы естественной резистентности не справились с инфекцией в самой ранней фазе. В этих случаях инфекционный процесс в легких чаще всего сопровождается избыточным воспалением и разрушением легочной ткани. Контроль за этими угрожающими жизни процессами осуществляется разными типами клеток, среди которых следует отметить регуляторные клетки: дендритные клетки (DCreg) и Т-клетки (Treg). В многочисленных работах нашей группы было показано, что особой склонностью к воспалению легочной ткани и ее избыточной инфильтрации различными лимфоидными клетками отличаются генетически чувствительные к ТБ мыши линии I/St. Ранее мы охарактеризовали влияние DCreg на иммунный ответ резистентных и чувствительных к ТБ мышей в клеточных культурах *in vitro*, где DCreg получали из высокоочищенных клеток костного мозга Lin⁻ после 6-дневного культивирования с клетками стромы легкого (Kapina et al., 2013). Нами было показано, что DCreg резистентных к туберкулезу мышей C57BL/6 подавляют пролиферативный ответ Т-клеток значительно сильнее, чем такие же клетки мышей линии I/St.

Получив результаты, указывающие на возможную связь между избыточным, плохо регулируемым воспалением у чувствительных к инфекции животных с количественным и функциональным недостатком регуляторных клеток, мы попытались ограничить избыточный ответ в легких зараженных мышей I/St линии внутривенным введением регуляторных дендритных клеток (DCreg). Мышей I/St заражали аэрогенным введением микобактерий (*M. tuberculosis* H37Rv, 102/мышь), через 2-3 недели после заражения вводили выращенные *in vitro* клетки DCreg (1 × 10⁶/мышь). Через 2 недели определяли в легких количество эффекторных Т-клеток CD4⁺CD25⁺FoxP3⁻ и регуляторных Т-клеток (Treg) с фенотипом CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺, продукцию цитокинов, гистологические изменения и количество микобактерий. Контрольными группами служили мыши, которым вводили выделенные из костного мозга и очищенные миелоидные клетки фенотипа CD11b⁺, и зараженные животные без введения клеток.

Введение DCreg мышам улучшало морфологическую картину в легких по сравнению с контрольными животными, на порядок снижало количество микобактерий в легких, в 2 раза увеличивало количество регуляторных Т-клеток с фенотипом CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ и уменьшало количество нейтрофилов в легких. При введении регуляторных дендритных клеток (DCreg) в легких этих мышей уменьшалась продукция IFN γ и IL-10, в то время как продукция TGF- β и IL-6 не изменялась. Продолжительность жизни животных при введении DCreg достоверно не увеличивалась.

Таким образом, было установлено, что регуляторные клетки действительно принимают участие в сдерживании патологического процесса при инфекции, но модуляция инфекционного процесса с помощью клеточной терапии является очень сложной задачей, решение которой требует, как минимум, детальных знаний о динамике воспалительного процесса, и кратности введения клеток.

Работа выполнена при поддержке гранта Российского Научного Фонда 15-15-30020.

ВЛИЯНИЕ СЕМАФОРИНА 3А НА ФУНКЦИИ ТИМОЦИТОВ МЫШИ

Рутто К.В., Кудрявцев И.В., Людыно В.И., Киселева Е.П.

ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины», Санкт-Петербург, Россия

Семафорин 3А (Sema 3A) известен как фактор, направляющий рост аксонов. Однако действие этого фактора гораздо шире и затрагивает клетки иммунной системы. В тимусе он синтезируется эпителиальными клетками и регулирует процесс адгезии тимоцитов к эпителиальным клеткам тимуса человека (Lepelletier Y., 2007).

Цель. Изучение влияния Sema 3A на пролиферацию, миграцию и адгезию тимоцитов к эпителиальным клеткам тимуса мыши.

Адгезию тимоцитов проводили на двух линиях эпителия тимуса мыши – кортикального сТЕС1-2 и медуллярного mTEC3-10 (Kasai M. et al., 1996). Пролиферацию тимоцитов изучали в присутствии конканавалина А (Con A) и без него с помощью МТТ-теста и визуального подсчета клеток. Миграцию тимоцитов мыши изучали с использованием поликарбонатных вставок с диаметром пор 5 мкм 24-луночного формата (Kim C. et al., 1998).

На первоначальном этапе исследований с использованием реакции обратной транскрипции с последующей полимеразной цепной реакцией (ОТ-ПЦР) было выявлено, что тимоциты экспрессируют мРНК следующих рецепторов Sema 3A: PlexA1, PlexA2, PlexA3 и Nrp-1. При исследовании поверхностной экспрессии рецепторов с помощью проточной цитометрии среди тимоцитов было выявлено 37,5% PlexA1⁺ клеток и 89,8% Nrp-1⁺ клеток. Полученные данные указывают на то, что тимоциты могут служить мишенями для действия Sema 3A.

С помощью МТТ-теста было показано, что Sema 3A снижает митоген-индуцированную пролиферацию тимоцитов в концентрациях 100 нг/мл (ОП₅₇₀ в контроле – 0,285±0,014, n = 6; с Sema 3A – 0,236±0,013, n = 5, p < 0,05) и 200 нг/мл (ОП₅₇₀ в контроле – 0,317±0,021, n = 6; с Sema 3A – 0,243±0,011, n = 6, p < 0,05). Полученные данные подтвердились при визуальном подсчете клеток (в контроле – 4,82±0,09 млн/мл, n = 3; с Sema 3A 100 нг/мл – 4,28±0,06 млн/мл, n = 3, p < 0,05; с Sema 3A 200 нг/мл – 3,48±0,11 млн/мл, n = 3, p < 0,05).

Далее было показано, что Sema 3A в концентрациях 10-200 нг/мл дозозависимо ингибировал адгезию тимоцитов к обеим клеточным линиям (при 30 и 120 мин инкубации) с максимальным эффектом в концентрации 200 нг/мл. Чтобы выяснить, какие клетки являются мишенью действия Sema 3A, тимоциты и эпителиальные клетки прединкубировали отдельно с Sema 3A (200 нг/мл) в течение 2 ч, после чего клетки отмывали 3 раза и проводили

адгезию в течение 30 мин. Ингибирующий эффект Sema 3A сохранялся только при предварительной обработке тимоцитов, как на сТЕС1-2 (индекс адгезии в контроле 33,12±0,57 n = 10; с Sema 3A 28,4±1,6 n = 10, p < 0,05), так и на mTEC3-10 (в контроле 39,66±0,82 n = 8; с Sema 3A 32,53±0,76 n = 10, p < 0,001). При этом предобработка Sema 3A клеток эпителия эффекта не давала. Обработка тимоцитов блокирующими антителами к Nrp-1 полностью отменяла ингибирующий эффект 200 нг/мл Sema 3A на адгезию тимоцитов к кортикальным (индекс адгезии в контроле 43,96±1,85 n = 6; с Sema 3A 21,58±9,96 n = 6; с Sema 3A и антителами к Nrp-1 – 42,67±1,33 n = 6, p < 0,001) и медуллярным клеткам (в контроле: 28,85±1,10 n = 6; с Sema 3A 24,40±1,59 n = 6; с Sema 3A и антителами к Nrp-1: 32,54±1,95 n = 6, p < 0,05). Таким образом, ингибирующий эффект Sema 3A был связан с его действием на тимоциты, а не на клетки эпителия, и опосредован через рецептор Nrp-1 на тимоцитах.

Кроме того, Sema 3A в концентрации 100 нг/мл оказывал хеморепеллентный эффект в отношении тимоцитов, а предобработка тимоцитов антителами к Nrp-1 отменяла эффект Sema 3A (индекс миграции в контроле 1,49±0,01 n = 5; с Sema 3A 0,65±0,08 n = 5, p < 0,001; с Sema 3A и антителами к Nrp-1 – 1,21±0,08 n = 5, p < 0,01).

Таким образом, были получены новые данные о влиянии Sema3A на пролиферацию, миграцию тимоцитов и их адгезию к эпителиальным клеткам тимуса, имеющие значение для лучшего понимания процесса созревания Т-лимфоцитов.

Работа поддержана грантом РФФИ № 15-04-06150.

ЛПС-СТИМУЛИРОВАННЫЕ МАКРОФАГИ МИГРИРУЮТ В ТИМУС И ИНДУЦИРУЮТ АПОПТОЗ ТИМОЦИТОВ

Семенова М.А., Сергеев В.Г.

ФГБОУ ВО «Удмуртский государственный университет» Ижевск, Россия

ФГБОУ ВО «Ижевская государственная медицинская академия», Ижевск, Россия

Введение. Представление о роли тимуса в иммунологических механизмах инфекционных заболеваний ограничивается представлением о закономерной акцидентальной инволюции этого органа в ходе формирования адаптационного синдрома в ответ на действие стрессорных инфекционных агентов. Наряду с данными о прямом атрофическом действии на тимус гормонов надпочечников, появляется информация о том, что и сами бактериальные агенты через клеточное опосредование влияют на интенсивность гибели тимоцитов. Важную роль в механизмах такого взаимодействия могут играть макрофаги, которые, как показали последние исследования, способны проникать в тимус после нагрузки антигеном на периферии и вызывать селективную клональную делецию тимоцитов, имеющих рецепторы к данному антигену.

Однако из этих экспериментов остается неясным ограничено ли их действие только делецией относительно зрелых антигенспецифических Т-клеток мозгового вещества, или мигрирующие в тимус макрофаги способны к индукции апоптоза малодифференцированных тимоцитов корковой зоны, т.е. участвовать в процессе атрофии тимуса. Для ответа на этот вопрос мы провели эксперимент, целью которого явилась оценка интенсивности

апоптоза Т-клеток различных областей тимуса крыс, вызываемого интраперитонеальным переносом аутологических макрофагов, предварительно активированных *in vitro* бактериальным полисахаридом и окрашенных прижизненным красителем для выяснения их топографической локализации в тимусе.

Материалы и методы. Исследование проведено на 28 крысах линии Вистар. У животных забирали клеточную взвесь интраперитонеального смыва и инкубировали в питательной среде RPMI-1640 в течение суток в пластиковых чашках Петри. Концентрировали содержание макрофагов посредством многократного отбора надосадка с неприкрепленными клетками. В культуральную среду опытной группы добавляли липополисахарид (ЛПС) *E. coli* (0,1 мкг/мл) и раствор прижизненного красителя 5-карбофлуоресцеин диацетата (0,5 мкг/мл); к контрольной группе добавляли только краситель. Через 24 часа инкубации, прикрепленные к пластику макрофаги, отделяли 0,02% раствором Версена и вводили интраперитонеально животному-хозяину. Через 24 часа после введения клеток, проводили декапитацию и тимэктомию животных. Отобранные тимусы делили на две части: из одной получали клеточную взвесь для анализа на проточном цитофлуориметре FACS Canto II (BD, USA), вторую подвергали иммуногистохимическому анализу на криостатных срезах. Для выявления тимоцитов в стадии апоптоза окрашивали их антителами к аннексину. Подсчет мигрировавших в тимус клеток проводили в программе Image-Pro Insight 6.0.

Результаты. Адаптивный перенос крысам аутологических макрофагов, предварительно активированных бактериальным липополисахаридом *in vitro*, усиливал миграцию этих клеток с периферии в тимус на $74,8 \pm 12,2\%$ ($P < 0,01$) относительно животных, которым вводили аутологичные макрофаги без активации эндотоксином. Гистологическое исследование показало, что меченые макрофаги, мигрировавшие в тимус, локализовались преимущественно в кортико-медулярной и субкапсулярной зонах, хотя часть клеток обнаруживалась и в корковой области. Иммуногистохимическое исследование продемонстрировало, что во всех этих зонах достоверно увеличивалось количество тимоцитов в состоянии раннего апоптоза ($P < 0,01$). Проточная цитофлуориметрия лейкоцитарной взвеси, полученной из тимусов животных контрольной и экспериментальной групп, также продемонстрировала достоверное увеличение количества тимоцитов на стадии раннего апоптоза после трансфера животным аутологических ЛПС-стимулированных макрофагов на $84,4 \pm 21,3\%$ ($P < 0,001$).

Заключение. Полученные результаты свидетельствуют о том, что неспецифическая стимуляция макрофагов бактериальным липополисахаридом усиливает их миграцию в те области тимуса, где идут процессы антигеннезависимой дифференцировки Т-клеток. Усиленная миграция активированных макрофагов сопровождается интенсификацией апоптоза тимоцитов в этих областях тимуса. Описанные факты расширяют наши представления о механизмах акцидентальной атрофии тимуса, добавляя к основным исполнителям макрофагов, мигрирующих в тимус с периферии после их активации бактериальным эндотоксином.

ОРГАНИЗАЦИЯ АНТИГЕННЫХ ДЕТЕРМИНАНТ, РАСПОЗНАВАЕМЫХ РЕГУЛЯТОРНЫМ РЕВМАТОИДНЫМ ФАКТОРОМ НА Fc-ФРАГМЕНТАХ IgG ЧЕЛОВЕКА

Сидоров А.Ю., Бедулева Л.В., Меньшиков И.В., Терентьев А.С., Ирина М.П.

ФГБОУ ВО «Удмуртский государственный университет», Ижевск, Россия

Введение. В недавно проведенных нами исследованиях было показано, что устойчивость к развитию экспериментально-вызванных аутоиммунных заболеваний, а также их ремиссия ассоциированы с продукцией популяции ревматоидного фактора, выявляемого методом агглютинации танализованных нагруженных гомологичным IgG эритроцитов (Beduleva, 2015). Полученные факты обозначают данную популяцию ревматоидного фактора как фактор регуляции аутореактивности и потенциальную биомаркер, усиливая продукцию которой, можно подавлять аутоиммунные реакции. Чтобы отличать популяцию ревматоидного фактора ассоциированного с устойчивостью к развитию экспериментальных аутоиммунных заболеваний от известных ранее популяций, продукция которых предсказывает и усиливает аутоиммунные заболевания, мы назвали ее регуляторный ревматоидный фактор (регРФ) (Sidorov, 2017). Мы также показали, что антигенные детерминанты для регРФ можно индуцировать на Fc фрагментах гомологичного IgG. Иммунизация крыс такими фрагментами вызывает повышение уровня регРФ и редукцию симптомов коллаген-индуцированного артрита (Sidorov, 2017). Было выяснено, что данные антигенные детерминанты формируются в шарнирной области Fc-фрагментов IgG, были найдены условия их индукции. Однако организация антигенных детерминант распознаваемых регРФ не ясна.

Цель и задачи. Целью исследования было выяснить организацию антигенных детерминант для регуляторного ревматоидного фактора на Fc-фрагментах IgG человека.

Материалы и методы. Fc-фрагменты IgG человека получали методом папаинового протеолиза. Выделение и очистку Fc фрагментов проводили методами эксклюзионной хроматографии на колонке Sephacryl S 100 26/400, аффинной хроматографии на protein A- и protein G-сефарозе. О наличии антигенных детерминант на Fc-фрагментах IgG для регуляторного РФ судили по способности последних вызывать дозозависимое торможение агглютинации нагруженных гомологичным IgG эритроцитов, вызванной регуляторным РФ. Количество свободных сульфгидрильных групп на Fc-фрагментах IgG человека определяли методом Элмана. Алкилирование сульфгидрильных групп проводили избытком йодацетамидом с последующей очисткой от примеси йодацетамидом методом эксклюзионной хроматографии на колонке Superdex 200 10/300.

Результаты. Были исследованы Fc-фрагменты IgG человека несущие и не имеющие антигенных детерминант узнаваемых регРФ человека. Обнаружено, что коэффициент поглощения Fc-фрагментов IgG, несущих антигенные детерминанты для регРФ, при 280 нм в 2 раза выше, чем Fc-фрагментов IgG, не имеющих таких детерминант. Данный факт указывает на то, что формирование антигенных детерминант для регРФ сопровождается изменением конформации Fc-фрагментов IgG. Все дисульфидные связи в шарнире Fc-фрагментов IgG человека,

несущих антигенные детерминанты для регРФ, восстановлены, обнаруживается 4 свободные сульфгидрильные группы/молекулу. Fc-фрагменты IgG человека, не имеющие детерминант для регРФ, содержат шарнир, однако тиольные группы в нем образуют дисульфидные связи. Алкилирование свободных сульфгидрильных групп Fc-фрагментов IgG ведет к потере свойства Fc-фрагментов IgG подавлять агглютинацию нагруженных IgG эритроцитов, вызванную регРФ. Данный факт не исключает, что SH группы шарнирной области непосредственно входят в состав антигенных детерминант, узнаваемых регРФ.

Заключение. Таким образом, формирование антигенных детерминант для регуляторного ревматоидного фактора на Fc-фрагментах IgG человека происходит в результате восстановления межцепочечных дисульфидных связей шарнира, сопровождающегося изменением конформации Fc-фрагментов IgG.

ИММУНОХИМИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ГЕТЕРОГЕННОСТИ РАСТВОРИМОГО ЭНДОГЛИНА ПЛАЗМЫ КРОВИ И ЕГО КОМПЛЕКСОВ

Смирнов И.В., Грязева И.В., Самойлович М.П.,
Шашкова О.А., Крутецкая И.Ю., Столбовая А.Ю.,
Крылова А.А.¹, Берлина М.А., Пиневиц А.А.,
Вартанян Н.Л., Климович В.Б.

Российский научный центр радиологии и хирургических технологий, Санкт-Петербург, Россия

Введение. Эндоглин (CD105) представляет собой гомодимерный мембранный антиген клеток сосудистого эндотелия с молекулярным весом 90 кДа. Он является компонентом рецепторных комплексов TGF- β , BMP и активина. Растворимая форма антигена образуется в результате протеолитического расщепления экстраклеточной части рецептора посредством MMP-14 и имеет молекулярный вес 80 кДа. Избыточное образование этого антигена может вызывать системную дисфункцию сосудистого эндотелия. Определение содержания этого эндоглина в плазме крови используют для оценки вероятности развития преэклампсии у беременных женщин и прогнозирования течения ряда онкологических заболеваний.

При создании двухцентровых иммуноферментных систем, направленных на выявление растворимого эндоглина, было обнаружено, что разные пары моноклональных антител выявляют различное (до двух порядков) содержание этого антигена в одних и тех же образцах плазмы крови человека. Эти результаты могут быть объяснены отсутствием или маскированием другими белками части эпитопов растворимого эндоглина.

Цель. Исследование аффинно выделенных из плазмы крови молекул растворимого эндоглина и копреципитирующих с ними белков.

Материалы и методы. Молекулы растворимого эндоглина и копреципитирующие с ними белки были выделены из пулового образца плазмы крови здоровых доноров посредством иммуноаффинной хроматографии. Их анализ вели с помощью методов электрофореза, иммуноблота и двухцентрового ИФА. Также был применен подход последовательного сепарирования молекулярных комплексов на мембранах с уменьшающимися диаметрами пор. Моноклональные антитела к эндоглину человека, использованные в исследовании, были получены и охарактеризованы в лаборатории гибридомной технологии (Смирнов И.В., 2015).

Результаты. С помощью элетрофореза в нативных условиях и иммуноблота показано, что молекулы растворимого эндоглина входят в состав надмолекулярных белковых комплексов с молекулярным весом более 200 кДа. Их размеры позволяют проходить через сепарирующие мембраны, имеющие пороги отсека 1000 и 300 кДа. Комплексы эндоглина задерживаются мембраной с порогом отсека 100 кДа.

Использование буферов с детергентными и хаотропными агентами при подготовке проб для электрофоретического разделения приводит к частичной дезинтеграции молекулярных комплексов эндоглина и появлению фракции свободных димерных и мономерных молекул антигена (160 и 80 кДа). Тем не менее, существенная часть молекул эндоглина остается связанной с другими белками. Добавление восстанавливающего реагента приводит к полной диссоциации комплексов растворимого эндоглина и формированию трех фракций антигена (80 кДа, 70 кДа и 60 кДа).

Заключение. С помощью иммунохимических методов продемонстрирована молекулярная гетерогенность растворимого эндоглина плазмы крови и вхождение этого антигена в состав молекулярных комплексов.

ВЛИЯНИЕ ПЕПТИДОГЛИКАН-РАСПОЗНАЮЩЕГО БЕЛКА TAG-7/PGLYRP-1 НА ВНУТРИКЛЕТОЧНОЕ ВЫЖИВАНИЕ LISTERIA MONOCYTOGENES

Слонова Д.А.^{1,2}, Посвятенко А.В.^{2,3},
Сысолятина Е.В.⁴, Еромолаева С.А.⁴,
Кибардин А.В.^{2,3}, Лысюк Е.Ю.^{2,3}, Гапонов А.М.²,
Гнучев Н.В.³, Георгиев Г.П.³, Ларин С.С.^{1,2,3}

¹ *Московский физико-технический институт (государственный университет), Москва, Россия*

² *ФГБУ «Национальный научно-практический центр детской гематологии, онкологии и иммунологии им. Дмитрия Рогачева» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия*

³ *ФГБУН «Институт биологии гена» РАН, Москва, Россия*

⁴ *ФГБУ «Федеральный научно-исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии им. почетного академика Н.Ф. Гамалеи» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия*

В настоящее время в медицине описано несколько заболеваний, вызываемых внутриклеточными патогенами (туберкулез, менингококковая инфекция, бруцеллез и другие). Одним из таких заболеваний является листериоз. Его возбудитель *Listeria monocytogenes* – широко распространенная грамположительная бактерия, обладающая способностью к внутриклеточному паразитизму. Лечение листериоза чаще всего проводится антибиотиками, однако в последнее время стали применять и комплексную терапию, направленную на усиление внутренней защиты организма. Одним из компонентов системы врожденного иммунитета является пептидогликан распознающий белок Tag-7/PGLYRP-1.

Цель. Исследовать влияние белка Tag-7/PGLYRP-1 на свойства бактерий и их взаимодействие с компонентами врожденного иммунитета.

Материалы и методы. В работе использовали человеческий пептидогликан-распознающий рекомбинантный белок Tag-7/PGLYRP-1, полученный с помощью эукариотической экспрессионной системы. Для оценки эф-

фективности антибиотиков использовались диски антибиотиков (Oxoid Ltd., England). Исследование фагоцитоза меченых $Cy3$ (GE Healthcare, Sweden) *L. monocytogenes* (EGD серовар 1/2а) проводилось на проточном цитометре (Cytomics FC 500 MPL, Beckman Coulter, Inc.). Анализировалось не менее 10000 событий. Эукариотические клетки кудьтивировались в питательной среде в CO_2 инкубаторе при 37 °С. Количество IL-6 определялось с помощью ИФА (R&D Systems).

Результаты. Полученный рекомбинантный человеческий белок Tag-7/PGLYRP-1 связывается с клеточными стенками бактерий, но не демонстрирует бактерицидной и бактериостатической активности при использовании концентрациях. Однако с помощью диско-диффузионного метода было выявлено, что в некоторых случаях присутствие Tag7/PGLYRP-1 может усиливать чувствительность бактерий к наличию антибактериальных препаратов.

С использованием макрофагоподобной клеточной линии ANA-1 продемонстрировано, что присутствие Tag-7/PGLYRP-1 стимулирует фагоцитоз внутриклеточных патогенных бактерий *L. monocytogenes*. С помощью инфекционной *in vitro* модели показано, что присутствие Tag-7/PGLYRP-1 ингибирует внутриклеточное выживание *L. monocytogenes*, предохраняя эукариотические клетки от заражения.

Белок Tag-7/PGLYRP-1 способствует выработке клетками ANA-1 активных форм кислорода, а так же провоспалительного цитокина IL-6.

Заключение. Полученные в данной работе результаты свидетельствуют о том, что пептидогликан-распознающий белок Tag-7/PGLYRP-1 активирует защитные механизмы врожденного иммунитета, препятствует заражению эукариотических клеток *L. monocytogenes*.

Работа поддержана грантом РФФИ № 15-04-07649.

Работа выполнена при финансовой поддержке Гранта Президента РФ для государственной поддержки ведущих научных школ Российской Федерации № НШ-9069.2016.4.

ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ ФАКТОРА, ИНГИБИРУЮЩЕГО МИГРАЦИЮ МАКРОФАГОВ, И ЕГО РЕЦЕПТОРА CD74 УСИЛИВАЕТСЯ ЦЕРУЛОПЛАЗМИНОМ С ЛАБИЛЬНО СВЯЗАННОЙ МЕДЬЮ

Соколов А.В., Костевич В.А., Горбунов Н.П., Грудина Н.А., Васильев В.Б.

ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины», Санкт-Петербург, Россия

Введение. Ранее нами было установлено, что медь-содержащий белок острой фазы воспаления церулоплазмин (ЦП), благодаря наличию лабильно связанных ионов меди, образует белок-белковый комплекс с фактором, ингибирующим миграцию макрофагов (МИФ) – ключевым цитокином воспаления. Введение насыщенного медью ЦП усиливало провоспалительную активность МИФ при моделировании септического шока у мышей *in vivo*, приводя к 100% смертности мышей, а аффинные антитела против МИФ препятствовали этому. Поскольку для активации провоспалительной активности МИФ необходимо его взаимодействие с инвариантной цепью главного комплекса гистосовместимости (CD74), были основания высказать гипотезу, что ЦП с лабильно связанной медью может влиять на взаимодействие МИФ и CD74. **Целью**

работы явилось исследование взаимодействия МИФ, ЦП и CD74. В задачи входило получение высокоочищенных белков и характеристика их взаимодействия.

Материалы и методы. Взаимодействие ЦП, МИФ и sCD74 изучали с помощью аффинной хроматографии, гель-фильтрации, электрофореза в полиакриламидном геле без детергентов и метода поверхностного плазмонного резонанса. Был клонирован внеклеточный домен рецептора CD74 (sCD74), получена плазида, кодирующая N-концевую полигистидиновую последовательность, сайт для гидролиза тромбином перед аминокислотной последовательностью sCD74. Отработан протокол, позволивший выделить высокоочищенный sCD74 из телец включения *E. coli* с помощью металл-хелатной хроматографии, гидролиза тромбином и аффинной хроматографии на МИФ-агарозе.

Результаты. Соответствие аминокислотной последовательности электрофоретически гомогенного sCD74 было доказано с помощью масс-спектрометрии фрагментов трипсинолиза (найденно 90% предсказанной последовательности). С помощью оптических сенсоров с иммобилизованным МИФ (BiaCore X-100) мы показали, что на взаимодействие МИФ и sCD74 практически не влияли ионы меди: константы диссоциации 19,1(+/-1,2) и 17,7(+/-0,9) нМ. ЦП лишенный ионов лабильной меди не влиял на взаимодействие МИФ и sCD74, напротив, присутствие ионов лабильной меди в ЦП увеличило сродство МИФ и sCD74 в 1,5 раза: константа диссоциации 12,2(+/-0,7) нМ. Аналогичные результаты были получены с помощью метода аффинной хроматографии: ЦП с лабильно связанными ионами меди способствовал взаимодействию sCD74 с иммобилизованным на агарозе МИФ. При гель-фильтрации ЦП, МИФ и sCD74 элюировались совместно в буфере, содержащем 5 мкМ сульфата меди.

Заключение. Таким образом, мы показали, что ЦП может усиливать взаимодействие МИФ с внеклеточным доменом CD74.

Исследование поддержано грантом РФФИ № 16-04-01182.

ИЗУЧЕНИЕ ПРОТИВОРАКОВЫХ СВОЙСТВ КОМПЛЕКСА ЛАКТОФЕРРИНА ЧЕЛОВЕКА С ОЛЕИНОВОЙ КИСЛОТОЙ

Соколов А.В., Власенко А.Ю., Костевич В.А., Старикова Э.А., Киселева Е.П., Васильев В.Б.

ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины», Санкт-Петербург, Россия

Введение. Белок грудного молока и секреторных гранул нейтрофилов, лактоферрин (ЛФ), обладает противораковой активностью, однако механизм его действия изучен не до конца. Недавно было показано, что ЛФ молока коров подобно альфа-лактальбумину образует комплекс с олеиновой кислотой, вызывающий апоптоз раковых клеток в культуре. **Целью** работы явилось исследование взаимодействия ЛФ человека с олеиновой кислотой и его противораковых свойств *in vitro* и *in vivo*. В задачи входило исследование липолитического эффекта ЛФ, изучение взаимодействия ЛФ и олеиновой кислоты, влияния комплекса на апоптоз культивируемых клеток, а также наблюдение за ростом гепатомы 22А после подкожной инокуляции мышам.

Материалы и методы. Липолиз после введения ЛФ мышам оценивали по концентрации неэстерифицированных жирных кислот в сыворотке крови. Взаимодействие ЛФ и олеиновой кислоты оценивали по связыванию кислоты с белком после диализа их смеси. Апоптоз клеток линий HL-60, THP-1, Jurkat оценивали с помощью проточной цитометрии. Гепатому 22А (20 000 клеток) инокулировали мышам линии СЗНА и ежедневно оценивали рост опухолей у контрольной группы животных и животных, получавших ежедневно внутривнутрибрюшинного по 4 мг комплекса ЛФ-олеиновая кислота.

Результаты. В течение 1-5 часов после внутривнутрибрюшинной инъекции мышам ЛФ человека (100 мг/кг) мы обнаружили увеличение концентрации неэстерифицированных жирных кислот в 1,8-3,8 раза. При добавлении раствора олеиновой кислоты в этаноле к ЛФ мы не наблюдали образования мицелл, характерного для смешивания олеиновой кислоты с водой и физиологическим раствором. Титрование ЛФ олеиновой кислотой показало, что один моль ЛФ может связать до 8 моль олеиновой кислоты. Комплекс ЛФ с олеиновой кислотой индуцировал апоптоз раковых клеток (HL-60, THP-1, Jurkat). При изучении динамики роста опухолей после инокуляции гепатомы 22А у мышей линии СЗНА в течение двух недель у пяти из девяти мышей, получавших комплекс ЛФ-олеиновая кислота, не наблюдалось заметного роста опухолей, в отличие от контрольной группы животных с практически равномерным и выраженным ростом опухолей. Однако на третью неделю наблюдений рост опухолей был замечен в обеих группах: средний диаметр опухолей в группе мышей, получавших комплекс лактоферрин-олеиновая кислота, составил 7(+/-4) мм, а у контрольных мышей средний диаметр опухолей составил 17(+/-)5 мм.

Заключение. Таким образом, мы показали, что комплекс ЛФ с олеиновой кислотой обладает противораковым эффектом *in vitro* и *in vivo*. В дальнейшем планируется оптимизировать дозу комплекса и схему его введения при исследовании противоракового эффекта *in vivo*. Исследование поддержано грантом Президента РФ МК-5074.2016.4.

ВЛИЯНИЕ КОМПЛЕКСА РЕКОМБИНАНТНЫХ АНТИГЕНОВ *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* НА КЛЮЧЕВЫЕ ЭФФЕКТОРЫ ИММУННОЙ СИСТЕМЫ

Солдатенкова А.В., Калошин А.А., Борисова О.В., Калиниченко Е.О., Ахматова Н.К., Михайлова Н.А.

ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова», Москва, Россия

Патологии, ассоциированные с *P. aeruginosa*, являются серьезной проблемой для иммунокомпрометированных пациентов. В ФГБНУ НИИВС им. И.И. Мечникова проводятся исследования по разработке вакцинного препарата против *P. aeruginosa* на основе рекомбинантных белков патогена.

Цель и задачи. Исследование влияния комплекса рекомбинантных антигенов *Pseudomonas aeruginosa* на систему адаптивного и врожденного иммунитета. Изучение протективного эффекта, синтеза специфических антител, уровня цитокинов и субпопуляционной структуры лимфоцитов селезенки мышей.

Объектом настоящего исследования явился комплекс рекомбинантных белков *P. aeruginosa* (белка F наружной

мембраны и рекомбинантной атотоксической формы экзотоксина А [анатоксин]).

Ранее подобраны оптимальные дозы рекомбинантных белков OprF и анатоксина для индукции защитного эффекта, которые составили 25 мкг и 50 мкг на мыш (при двукратном введении) соответственно. В настоящей работе исследовали иммунный ответ на введение с двухнедельным интервалом комплекса рекомбинантных белков, сорбированных на гидроксиде алюминия в тех же дозах.

Протективный эффект оценивали по выживаемости мышей линии Balb/C после заражения живой вирулентной культурой *P. aeruginosa*, рассчитывая ЛД₅₀ и индекс эффективности. В результате проведенных экспериментов показано, что комплекс белков защищал животных с индексом эффективности 2,5.

Уровень синтеза специфических антител исследовали в ИФА с сорбированными на планшете рекомбинантными белками. Выявлено существенное увеличение концентрации специфических IgG-антител в ответ на иммунизацию исследуемым комплексом по сравнению с интактными животными.

Уровень цитокинов определяли на проточном цитометре FC-500 (Beckman Coulter, США) при помощи тест-системы FlowCytomix Mouse Th1/Th2 10 plex. Через 4 ч, 8 ч, 24 ч и 14 дней после первой иммунизации осуществляли тотальный забор крови у групп мышей. Максимальные значения Th1-цитокинов наблюдали: к 24 ч для TNF α (увеличение в 8,5 раз), к 8 часам для IL-1 β (в 13,4 раза), к 4 часам для IL-1 α (в 5,1 раз), к 8 ч для IL-2 (увеличение в 2,7 раз), к 24 часам для IFN γ и IL-12p70 (в 10,9 и 5,3 раз соответственно). Максимальные значения Th2-цитокинов в сыворотках наблюдали через 8 часов для IL-4 (увеличение в 1,4 раза), к 4 часам для IL-5 (в 2,9 раз) и к 24 часам в случае IL-6, IL-10, IL-13 (увеличение в 5,4; 3,7 и 1,5 раза соответственно). Динамика Th17-/Th21-/Th22-цитокинов в сыворотках мышей под воздействием комплекса рекомбинантных белков была следующей: IL-17A максимально повышался через 8 часов (в 248,4 раза), IL-21 – через 8 ч (увеличение с 0 до 17,33 пкг/мл), IL-22 – через 8 часов (в 3,2 раза).

Для изучения субпопуляционной структуры лимфоцитов через две недели после курса иммунизаций у животных извлекали селезенки, выделяли спленоциты и окрашивали моноклональными антителами, меченными флюорохромом, к поверхностным клеточным маркерам (Caltag Laboratories, США). Исследование показало, что в опытной группе (иммунизированные мыши) повышалось содержание NK-клеток (CD16⁺/CD32⁺, в 1,64 раз), Т-хелперов (CD4⁺, в 1,25 раз), В1-лимфоцитов (CD5⁺, в 1,13 раз), В2-лимфоцитов (CD19⁺, в 2,3 раз) при снижении численности цитотоксических лимфоцитов (CD8⁺, в 1,47 раз) по сравнению с контролем (неиммунизированные мыши). В общей популяции клеток повышалось содержание типов, экспрессирующих маркеры ранней (CD25⁺) и поздней (MHCII⁺) активации клеток.

Таким образом в результате проведенных исследований установлена активация клеточных и гуморальных звеньев иммунной системы в ответ на введение исследуемого комплекса рекомбинантных белков, что открывает перспективы для создания вакцины на его основе.

Работа выполнена при поддержке Программы фундаментальных исследований Президиума РАН «Фундаментальные исследования для разработки биомедицинских технологий» на 2016 год.

РОЛЬ МЕТАБОЛИЗМА АРГИНИНА В РЕГУЛЯЦИИ ВРОЖДЕННОГО И ПРИОБРЕТЕННОГО ИММУНИТЕТА

Старикова Э.А.

ФБГНУ «Институт экспериментальной медицины»,
Санкт-Петербург, Россия

Аргинин – условно заменимая протеиногенная аминокислота, которая играет важную роль в эмбриогенезе, раннем развитии и регуляции функций клеток иммунной системы (Carroll B. et al., 2016; Bronte V. et al., 2005). Большинство клеток млекопитающих, включая гранулоциты, эритроциты, гепатоциты, миелоидные супрессорные клетки, тучные клетки, эндотелиальные клетки и гладкомышечные клетки в разной степени экспрессируют ферменты, метаболизирующие аргинин-аргиназу и NO-синтазу. Аргинин является единственным физиологически значимым субстратом для синтеза NO – важного внутри- и межклеточного медиатора, который обеспечивает цитотоксичность клеток врожденного иммунитета, направленную на борьбу с патогенными микроорганизмами (Bogdan C., 2015). С дефицитом аргинина и его метаболитов связывают механизм действия миелоидных супрессорных клеток, которые вызывают длительное подавление пролиферации Т-лимфоцитов и снижение экспрессии CD3 ζ (Bronte V. et al., 2005). Дефицит аргинина приводит к инволюции тимуса и снижению количества Т-лимфоцитов у мышей после массивного хирургического вмешательства (Morris S.M.Jr. et al., 2012). В отсутствие аргинина полностью блокируются экспозиция гранул и цитотоксичность NK-клеток, значительно подавляются их пролиферация и секреция цитокинов (Oberlies J. et al., 2009). Снижение доступности аргинина в микроокружении клеток костного мозга приводит к изменению экспрессии генов, регулирующих дифференцировку В-лимфоцитов на стадии про-В/пре-В клеток (Le Bien T.W. et al., 2002). Несмотря на многочисленные данные, свидетельствующие о важной роли этой аминокислоты в регуляции функций клеток иммунной системы, молекулярные механизмы, последствий деpleции аргинина остаются мало изученными. В последнее время в литературе появились данные о том, что аргинин является одним из ключевых активаторов сигнального пути mTOR (mechanistic target of rapamycin). В нативном состоянии, независимо от своих метаболических путей аргинин способствует максимальной активации серин-треонин протеинкиназы mTORC1 – центрального комплекса сигнального пути mTOR (Carroll B. et al., 2016).

Сигнальный путь mTOR интегрирует сигналы доступности питательных веществ, сигналы от ростовых факторов, цитокинов, иммунорецепторов и как следствие, направляет дифференцировку и реализацию эффекторных функций клеток лимфоидного и миелоидного ряда (Keating R. et al., 2016; O'Neill L. A.J. et al., 2016; Weichhart T. et al., 2015). Благодаря mTOR-опосредованной модуляции процессов автофагии, биогенеза лизосом и экспрессии МНСII осуществляется регуляция презентации антигенов клетками системы врожденного иммунитета. Контроль процесса синтеза белков со стороны mTOR является одним из важнейших механизмов регулирующих продукцию провоспалительных и противовоспалительных цитокинов (Nyamdelger S. et al., 2016). mTOR выступает как важнейший регулятор баланса дифференцировки между регуляторными и эффекторными субпопуляциями Т-лимфоцитов. Активация PI3K/mTOR сигнального пути способствует дифференцировке эффекторных популяций Т-лимфоцитов. Напротив, специфическая ингибция mTOR коррелирует со снижением генерации Th1-, Th2- и Th17-клеток и усилением генерации Treg (Coquillard C. et al., 2015).

В ходе развития бактериальной инфекции аргинин становится субстратом для бактериальных ферментов аргиназы и/или аргининдеиминазы, кроме того некоторые бактерии могут катаболизировать аргинин опосредованно, индуцируя экспрессию аргиназы организма-хозяина (Das P. et al., 2010). Такая стратегия патогенов может приводить к нарушению дифференцировки и функциональной активности клеток иммунной системы, дисрегуляции процесса воспаления и иммунного ответа. Эта проблема заслуживает большего внимания иммунологов.

ИССЛЕДОВАНИЕ МЕХАНИЗМА ДЕЙСТВИЯ РЕГУЛЯТОРНОГО РЕВМАТОИДНОГО ФАКТОРА, СДЕРЖИВАЮЩЕГО РАЗВИТИЕ АУТОИММУННЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ

Столярова Е.Ю.¹, Бедулева Л.В.¹, Снигирев А.А.²,
Литвинюк А.А.¹, Падерина Л.А.¹

¹ ФГБОУ ВО «Удмуртский государственный
университет», Ижевск, Россия

² БУЗ УР «Удмуртский Республиканский Центр по
профилактике и борьбе со СПИДом и инфекционными
заболеваниями», Ижевск, Россия

Введение. Недавно нами был выявлен ревматоидный фактор, получивший название регуляторный (регРФ),

**ТАБЛИЦА. КОЛИЧЕСТВО CD4⁺, CD4⁺CD95⁺ ЛИМФОЦИТОВ В КРОВИ И ЛИМФАТИЧЕСКИХ УЗЛАХ КРЫС,
ИММУНИЗИРОВАННЫХ ОБМ (К ТЕЗИСАМ СТОЛЯРОВОЙ Е.Ю. И ДР.)**

		Кровь	Лимфоузлы	Титр регРФ в крови
CD4 ⁺ , %	РегРФ+крысы	22±5,8	55±4,0*	32±17,5
	РегРФ-крысы	20±4,4	63±5,6	0±0,0
	Интактные крысы	32±10,3	76±9,9	0,8±1,8
CD4 ⁺ CD95 ⁺ , %	РегРФ+крысы	28±8,6	17±1,4	32±17,5
	РегРФ-крысы	32±7,4	14±2,6	0±0,0
	Интактные крысы	35±11,0	17±2,0	0,8±1,8

Примечание. * – статистически значимое различие между РегРФ+ крысами и РегРФ- крысами, p < 0,05, критерий Манна–Уитни.

продукция которого обеспечивает устойчивость к развитию экспериментальных аутоиммунных заболеваний, а также ассоциирована с ремиссией последних и завершением нормального иммунного ответа (Beduleva, 2015; Sidorov, 2017). Однако механизм действия регуляторного ревматоидного фактора остается не ясен. Мы предполагаем, что регРФ предотвращает развитие экспериментально-вызванных аутоиммунных заболеваний и вызывает их ремиссию посредством сдерживания экспансии Т-хелперов специфичных к антигенам-индукторам аутоиммунных заболеваний и аутореактивных Т-хелперов, активирующихся в ответ на иммунизацию.

Цель и задачи. Проверить гипотезу о том, что регРФ сдерживает экспансию активированных Т-хелперов, специфичных к антигенам-индукторам аутоиммунных заболеваний, вызывая их гибель по механизму апоптоза.

Материалы и методы. Крыс Wistar иммунизировали основным белком миелина морской свинки (ОБМ) (Sigma). На 7 день после иммунизации забирали регионарные лимфатические узлы (л/у) и кровь. Измеряли цитофлуориметрически количество $CD4^+$ и $CD4^+CD95^+$ лимфоцитов в периферической крови и л/у. В крови измеряли регРФ методом агглютинации таннизированных нагруженных гомологичным IgG эритроцитов. Клетки л/у иммунизированных крыс культивировали в течение 5 дней в присутствии ОБМ, затем клетки обрабатывали регРФ-содержащей сывороткой и определяли количество погибших клеток в том числе несущих маркеры апоптоза с помощью Annexin V Apoptosis Detection Kit FITC.

Результаты. Было показано, что у иммунизированных ОБМ крыс с относительно высоким уровнем регРФ в крови (регРФ⁺ крысы) относительное количество $CD4^+$ лимфоцитов в л/у достоверно ниже ($p < 0,05$, критерий Манна–Уитни), чем у иммунизированных ОБМ крыс с низким уровнем регРФ (регРФ⁻ крысы) (табл.). В крови исследуемых групп крыс уровень $CD4^+$ лимфоцитов не отличается. Мы предполагали, что мишенью регРФ являются активированные $CD4^+$ лимфоциты, несущие маркер CD95, опосредующий апоптоз, через взаимодействие с которым регРФ реализует свое цитотоксическое действие, и ожидали обнаружить у крыс с относительно высоким уровнем регРФ достоверное снижение количества $CD4^+CD95^+$ лимфоцитов по сравнению с крысами с относительно низким уровнем регРФ. Однако количество $CD4^+CD95^+$ лимфоцитов в л/у и крови у крыс с относительно высоким и относительно низким уровнем регРФ не отличается. Полученные факты свидетельствуют о том, что регРФ сдерживает экспансию активированных $CD4^+$ лимфоцитов, но CD95 молекула не является мишенью для регРФ.

Обработка лимфоцитов л/у, культивированных 5 дней в присутствии ОБМ, сывороткой содержащей регРФ, полученной от крыс иммунизированных ОБМ, вызвала гибель лимфоцитов, но доля клеток, связывающих аннексин V, была незначительной. Сыворотка, содержащая регРФ, не вызывала гибель не активированных лимфоцитов.

Заключение. Таким образом, регуляторный ревматоидный фактор вызывает некроз активированных $CD4^+$ лимфоцитов. CD95 не является мишенью для регуляторного ревматоидного фактора.

Работа поддержана грантом РФФИ 16-34-01154 мол_а.

ХАРАКТЕРИСТИКА ПОПУЛЯЦИЙ И КЛОНОВ НК-КЛЕТОК, ПОЛУЧЕННЫХ ПУТЕМ СТИМУЛЯЦИИ ИНТЕРЛЕЙКИНОМ 2 И ГЕНЕТИЧЕСКИ-МОДИФИЦИРОВАННЫМИ ФИДЕРНЫМИ КЛЕТКАМИ K562, ЭКСПРЕССИРУЮЩИМИ МЕМБРАНОСВЯЗАННЫЙ ИНТЕРЛЕЙКИН 21

Стрельцова М.А., Ерохина С.А., Каневский Л.М., Коваленко Е.И.

ФГБУН «Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова» РАН, Москва, Россия

Стимуляция НК-клеток фидерными клетками K562, экспрессирующими на своей поверхности IL-21 (K562-mbIL21) в сочетании с IL-2 индуцирует интенсивную пролиферацию натуральных киллеров, что может быть использовано для накопления НК-клеток в иммунотерапевтических целях. Однако величина экспансии НК-клеток, полученных от разных индивидов, значительно варьирует. Одна из причин таких вариаций может быть связана с тем, что данная комбинация стимулов по-разному действует на клетки различной степени дифференцировки и активации. Чтобы ответить на этот вопрос, в настоящей работе указанный метод стимуляции был применен к индивидуальным НК-клеткам, предварительно охарактеризованным по уровню экспрессии молекул CD56, CD57 и HLA-DR, с целью получения клонов НК-клеток из субпопуляций, различающихся по степени дифференцировки и активации. С помощью цитометрического анализа были дискриминированы субпопуляции наименее дифференцированных НК-клеток $CD56^{bright}$, промежуточных $CD56^{dim}CD57^-$ и наиболее дифференцированных $CD56^{dim}CD57^{bright}$. В кластерах $CD56^{bright}$ и $CD56^{dim}CD57^-$ были дополнительно выделены субпопуляции клеток с фенотипом HLA-DR⁻ и HLA-DR⁺. Единичные НК-клетки из пяти указанных субпопуляций были отсортированы в лунки 96-луночного планшета, содержащего IL-2 и облученные клетки K562-mbIL-21. Частота образования клонов НК-клеток, которую определяли через 3 недели культивирования, оказалась выше в субпопуляциях $CD56^{bright}$, по сравнению с субпопуляциями $CD56^{dim}$, а наименьшая частота оказалась в субпопуляции НК-клеток, высоко экспрессирующих маркер терминальной дифференцировки CD57. Существенной связи экспрессии маркера «поздней» активации HLA-DR с эффективностью генерации клонов из данной субпопуляции не было выявлено. Фенотипический анализ полученных клонов показал, что, как правило, описанная стимуляция приводит к экспансии менее зрелых клеток, экспрессирующих рецептор NKG2A с низким уровнем экспрессии CD57. Часть клонов из субпопуляции $CD57^+$ при культивировании утрачивало экспрессию этого маркера. Доля клонов, экспрессирующих ингибирующие рецепторы KIR2DL2/DL3, оказалась наиболее низкой в субпопуляции HLA-DR⁺, при этом экспрессия этих рецепторов значительно не менялась при культивировании клонов.

Таким образом, на клональном уровне охарактеризованы НК-клеточные культуры, полученные путем стимуляции с помощью IL-2 и K562-mbIL-21 НК-клеток с разным уровнем зрелости и активации. Показано, что в ответ на такую стимуляцию лучше пролиферируют менее дифференцированные клетки, а хуже – более дифференцированные. Полученные результаты могут помочь

в селекции НК-клеток, наиболее подходящих для потенциальной адоптивной иммунотерапии.

Работа выполнена при поддержке РФФ (грант № 16-15-00309).

ВЛИЯНИЕ ПЕПТИДНОЙ ТЕРАПИИ НА АКТИВНОСТЬ ВОСПАЛИТЕЛЬНОГО ПРОЦЕССА В ЛЕГКИХ (НА МОДЕЛИ ХОБЛ У КРЫС)

Суркова Е.А., Лебедева Е.С., Кузубова Н.А.

ФГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. И.П. Павлова» Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург, Россия

Введение. Согласно современным представлениям, эпителиоциты бронхов являются ключевыми эффекторными клетками в патогенезе хронической обструктивной болезни легких (ХОБЛ), инициируя иммунную и воспалительную реакции, гиперсекрецию слизи и продукцию активных форм кислорода. Стимулирование эндогенных регенеративных возможностей для восстановления поврежденного эпителия при ХОБЛ может обеспечить длительный терапевтический эффект по сравнению с использованием традиционных кортикостероидов.

Цель. Оценить противовоспалительный и регенеративный эффект низкомолекулярной пептидной терапии на модели ХОБЛ у крыс.

Материалы и методы. Модель формирования ХОБЛ выполнена на крысах-самцах линии Вистар с помощью ингаляционного воздействия диоксида азота. Пептидную терапию проводили в течение месяца, используя препарат Бронхоген (ООО ХБО при РАН «Фирма Вита») – синтезированный тетрапептид, соответствующий полипептиду из слизи бронхов животных. В пробах бронхоальвеолярной лаважной жидкости (БАЛЖ) определяли содержание TNF α , IL-8, нейтрофильной эластазы, матриксной металлопротеиназы-12 (MMP-12), химазы тучных клеток, секреторного иммуноглобулина А (sIgA), сурфактантного протеина В (SP-B) методом ELISA.

Результаты. В БАЛЖ животных, не получавших пептидную терапию (контрольная группа), содержание нейтрофилов в 5 раз превышало интактное значение (25,9 \pm 4,1 и 5,2 \pm 0,5% соответственно, $p < 0,05$), а число лимфоцитов было в 2 раза больше, чем у интактных крыс (18,5 \pm 2,4 и 9,1 \pm 1,9% соответственно, $p < 0,05$). В лаважной жидкости контрольных крыс определялись повышенные концентрации провоспалительных цитокинов (TNF α и IL-8) нейтрофильной эластазы, MMP-12 и химазы тучных клеток, действие которой значительно усиливает деструктивный эффект на легочные структуры. Под влиянием применения Бронхогена происходило восстановление цитологического профиля БАЛ, который незначительно отличался от интактной группы: процентное содержание нейтрофилов снижалось по сравнению с контролем и составляло 9,0 \pm 1,2% ($p < 0,05$), возрастала доля макрофагов (76,5 \pm 2,02%, $p < 0,05$). Концентрации TNF α , IL-8, а также нейтрофильной эластазы и MMP-12 практически не отличались от показателей интактной группы, а уровень химазы тучных клеток оказался в 2 раза ниже интактного. Нормализовалось содержание SP-B, что могло быть отражением восстановления секреторной функции альвеолоцитов 2-го типа. Значительно возросла интенсив-

ность синтеза sIgA, превышая аналогичный показатель и в контрольной, и в интактной группе.

Заключение. Под влиянием пептидной терапии наблюдалось снижение активности нейтрофильного воспаления, которое сопровождалось восстановлением функциональной активности бронхиального эпителия, предупреждением аномального ремоделирования легочной ткани и связанных с ним тяжелых осложнений ХОБЛ.

АЛЬВЕОЛЯРНЫЕ МАКРОФАГИ И СУРФАКТАНТ ЛЕГКИХ ПРИ ДИСБАЛАНСЕ ДОФАМИНЕРГИЧЕСКОЙ НЕЙРОТРАНСМИССИИ

Тимофеева М.Р., Лукина С.А.

ФГБОУ ВО «Ижевская государственная медицинская академия», Ижевск, Россия

Введение. Дисфункция дофаминергической системы является основой патогенеза нейродегенеративных и нервно-психических заболеваний, висцеропатий, сопровождающихся изменениями иммунного статуса организма (Крыжановский Г.Н. и соавт., 2010) и метаболических функций легких (Тимофеева М.Р. и соавт., 2015). Установлено, что альвеолярные макрофаги участвуют в реализации механизмов врожденного и адаптивного иммунитета, в катаболизме сурфактанта легких (Черешнев В.А. и соавт., 2002). Вместе с тем, фосфолипиды сурфактанта стимулируют фагоцитарную активность альвеолярных макрофагов (Грачева Л., 1996; Ипатова О.М., 2005), а сурфактант-ассоциированные протеины модулируют их участие в иммунном ответе и секреции провоспалительных цитокинов (Sano H. et al., 2005).

Цель. Изучение фагоцитарной активности альвеолярных макрофагов и фосфолипидов сурфактанта при дисбалансе дофаминергической нейротрансмиссии, моделируемой введением допамина в боковой желудочек мозга и активацией стриатума без и при введении амантадина.

Материалы и методы. Опыты выполнены на наркотизированных крысах-самцах в соответствии с этическим кодексом ($n = 77$), в том числе ложнопериоперированных, с церебровентрикулярным введением допамина (в дозе 1,6 мкМ, через день, три недели) посредством канюль: Р = 0,8; L = 1,5; V = 3,6, с имплантацией нанокобальта в стриатум: А = 1,7; L = 2,5; V = 5,5 и в сочетании с введением амантадина (ПК-Мерц, Германия; 1 мг/кг, через день, 2 недели, в/брюшинно). После окончания экспериментов определяли содержание фосфолипидов (Комаров Ф.И. и соавт., 1981) в бронхоальвеолярных смывах (БАС) и их поверхностную активность (метод Вильгельми), клеточный состав смывов и фагоцитарную активность альвеолярных макрофагов (АМ) по поглощению частиц монодисперсного латекса ($\varnothing 1,5$ мкм) с расчетом фагоцитарного индекса и фагоцитарного числа. Фракционирование фосфолипидов проводили методом тонкослойной хроматографии. Статистический анализ выполнен в программе SPSS 17 с использованием критерия Шапиро–Уилка и U-критерия Манна–Уитни.

Результаты. Дисбаланс дофаминергической системы, индуцированный введением допамина в боковой желудочек мозга, сопровождался повышением продукции фосфолипидов ($p = 0,03$) за счет фракции лизофосфатидилхолина ($p = 0,001$), и фосфатидилэтаноламина ($p = 0,02$), фосфатидной кислоты ($p = 0,001$), что привело к снижению поверхностной активности сурфактанта ($p = 0,001$), но стимулировало фагоцитарную активность

АМ ($p = 0,01$). При моделировании очага патологической активности в стриатуме, характеризующегося высокой плотностью дофаминовых рецепторов, увеличился оборот фосфолипидов ($p = 0,001$) и активность механизмов врожденного иммунитета, о чем свидетельствовало повышение фагоцитарного индекса ($p = 0,006$) и фагоцитарного числа ($p = 0,001$). При введении ПК-Мерц, стимулирующего высвобождение дофамина и блокирующего NMDA-рецепторы глутамата, увеличилась продукция фосфолипидов ($p = 0,001$) с низкими поверхностно-активными свойствами ($p = 0,001$), как и при активации стриатума, но способность АМ к фагоцитозу снизилась ($p = 0,001$) по сравнению с воздействием на стриатум, а фагоцитарное число соответствовало контролю.

Заключение. При дисбалансе дофаминергической нейротрансмиссии сопряженность изменения состава фосфолипидов сурфактанта и фагоцитарной активности альвеолярных макрофагов определяет эффективность механизмов врожденного иммунитета легких и органной резистентности.

ВЛИЯНИЕ АНГИОТЕНЗИНА-II НА ЛИТИЧЕСКУЮ АКТИВНОСТЬ МНОЖЕСТВЕННО МОДИФИЦИРОВАННЫХ ЛИПОПРОТЕИНОВ НИЗКОЙ ПЛОТНОСТИ У КРЫС В ЭКСПЕРИМЕНТЕ

Толпыго С.М.¹, Шойбонов Б.Б.^{1,2}, Лагутина Л.В.¹

¹ ФГБНУ «Научно-исследовательский институт нормальной физиологии им. П.К. Анохина», Москва, Россия

² ФГБУ «Государственный научно-исследовательский центр профилактической медицины» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

Общепризнано, что эндогенные множественно модифицированные липопротеины низкой плотности (ммЛНП) и ангиотензин-II (А-II) – основной эффекторный пептид ренин-ангиотензиновой системы – играют ведущую роль в развитии сосудистой эндотелиальной дисфункции и запуске иммунных процессов при атеросклерозе. Показано также, что ммЛНП оказывают цитотоксическое действие на эндотелий сосудов, вызывая воспаление и фиброз. Ранее нами разработан способ определения литической активности ммЛНП и иммунных комплексов, содержащих ммЛНП (ИК-ммЛНП), позволяющий определить патогенность, т.е. атерогенность, данных соединений. Определение литической активности основано на наличии лизофосфатидилхолина и фосфолипазы А2 в составе ммЛНП, которые вызывают лизис собственных эритроцитов.

Эксперименты проведены на 40 крысах-самцах популяции Wistar (по 10 особей в группе) с массой тела 320-350 г. Животным однократно вводили: 1 группа – конъюгат А-II с ммЛНП (в дозе 300 мкг/кг по А-II и 200 мкг/кг по носителю в 0,5 мл физиологического раствора); 2 группа – белок-носитель – ммЛНП (в дозе 200 мкг/кг в 0,5 мл физиологического раствора); 3 группа – смесь А-II, ммЛНП и физиологического раствора; 4 группа – 0,5 мл физиологического раствора. Конъюгирование А-II и ммЛНП осуществляли карбодиимидным методом, при этом 1 молекула ммЛНП связывалась с 10-12 молекулами А-II. Использовали естественно модифицированные окислением ЛНП, выделенные из сыворотки крови больных атеросклерозом с применением разработанного нами метода. Через 5-6 месяцев после однократного введения веществ у животных

1-4 групп в сыворотке крови определяли содержание эндогенных ммЛНП, ИК-ммЛНП, а также оценивали их литическую активность. Тест литической активности проводили в 96-луночных плоскодонных иммунологических планшетах по 3 повтора. Сыворотки крови крыс обрабатывали 20% раствором поливинилпирролидона с молекулярной массой 35000 (ПВП-35000) при объемном соотношении сыворотка: ПВП (1:0,84), инкубации в течение 10 мин при комнатной температуре. Агрегаты ммЛНП осаждали центрифугированием, тщательно декантировали и осадок ммЛНП растворяли в буфере без ПВП. Вначале по 10 мкл ($\times 3$) ммЛНП или ИК-ммЛНП вносили в лунки, потом добавляли 60 мкл ($\times 3$) буфера VBS2+ и 30 мкл ($\times 3$) суспензии стандартизованных в этом же буфере эритроцитов барана. Параллельно ставили контроли: 3 контроля на полный лизис (30 мкл суспензии аутологических эритроцитов + 70 мкл H_2O); 3 контроля на спонтанный лизис эритроцитов (30 мкл аутологических эритроцитов + 70 мкл буфера VBS2+). Тщательно перемешивали и сразу измеряли оптическую плотность на фотометре для иммуноферментного анализа при длине волны 620 нм (бланк устанавливали против воздуха). После измерения планшеты герметично заклеивали пленкой и оставляли на 48 часов при комнатной температуре, затем планшету тщательно перемешивали и измеряли оптическую плотность при тех же условиях, по калибровочному графику определяли степень лизиса и при лизисе более 10% констатировали повышенную литическую активность ммЛНП или ИК-ммЛНП.

Получены следующие данные об атерогенности ммЛНП. В 1-ой группе (комплекс ммЛНП с А-II) и 3-ей группе (смесь ммЛНП с А-II) литическая активность повышена у 70% крыс (у 7 из 10 животных в группе). Во 2 группе (ммЛНП) также наблюдается повышение литической активности в 50% случаев. В 4-ой группе (введение физиологического раствора) литическая активность повышается только у 20% животных. Таким образом, даже после однократного введения комплекса А-II с ммЛНП, ммЛНП, смеси А-II и ммЛНП через 5-6 месяцев их эндогенные ммЛНП в сыворотке крови характеризуются повышенной патогенностью (атерогенностью).

При оценке литической активности ИК-ммЛНП обнаружено, что в 1-ой группе (комплекс ммЛНП с А-II) у 40% крыс ИК-ммЛНП утрачивают литическую активность, в 10% – даже увеличивают ее (с 21% для ммЛНП до 30% в составе ИК-ммЛНП). Показано, что у всех животных 2-ой (ммЛНП) и 3-ей (смесь ммЛНП с А-II) групп патогенность ИК-ммЛНП полностью отсутствует. У части (20%) крыс 4-ой группы (физиологический раствор) литическая активность ИК-ммЛНП снижается (с 30% для ммЛНП до 13% в составе ИК-ммЛНП), у остальных контрольных животных не изменяется. Полученные данные свидетельствуют о протективной роли ИК-ммЛНП при развитии аутоиммунного ответа на ммЛНП в организме и функциональной гетерогенности образующихся при этом аутоантител. А-II, по-видимому, за счет своей выраженной прооксидантной и провоспалительной активности обуславливает дополнительную модификацию ммЛНП, увеличивая тем самым их патогенность и прогрессирующее атеросклеротическое процесса.

ИММУННЫЕ МЕХАНИЗМЫ АКТИВАЦИИ ПРОВСПАЛИТЕЛЬНОЙ СИГНАЛИЗАЦИИ В КИШЕЧНО- АССОЦИИРОВАННОЙ ЛИМФОИДНОЙ ТКАНИ В УСЛОВИЯХ ХРОНИЧЕСКОГО СОЦИАЛЬНОГО СТРЕССА

Топол И.А.

Запорожский государственный медицинский
университет, Запорожье, Украина

Введение. Ситуация, сложившаяся в последние годы в современном обществе, характеризуется высоким уровнем социального напряжения, при котором стрессы приобретают затяжной характер. Хронический социальный стресс (ХСС) способен вызывать нарушения не только в нейроэндокринной системе, провоцируя развитие депрессии и тревоги, но и приводить к изменениям функционирования врожденного и адаптивного иммунитета.

Цель. Изучение влияния ХСС на распределение TLR2⁺/4⁺, NF-κB⁺, T-bet⁺, GATA3⁺, RORγt⁺, FoxP3⁺, LMP2⁺, XBP1⁺ лимфоцитов в кишечно-ассоциированной лимфоидной ткани.

Материалы и методы. Исследование проводили на 70 самках крыс линии Вистар, которые были разделены на три экспериментальные группы: контрольные крысы (группа 1); крысы, которым моделировали ХСС1 путем трехнедельной социальной изоляции и длительного психоэмоционального воздействия (группа 2); крысы, которым моделировали ХСС2 путем содержания животных в перенаселенных клетках с ежедневной сменой состава (группа 3). Уровень эмоционально-поведенческой и исследовательской активности изучали в тестах «открытое поле» и «перегородка»; в тесте Порсолта («принудительное плавание») определяли уровень депрессивности животных.

Структуру популяции TLR2⁺/4⁺, NF-κB⁺, T-bet⁺, GATA3⁺, RORγt⁺, FoxP3⁺, LMP2⁺, XBP1⁺ клеток изучали на основании анализа серийных гистологических срезов, окрашенных моно- и поликлональными антителами к TLR2/4, NF-κB, T-bet, GATA3, RORγt, FoxP3, LMP2, XBP1 крыс, с использованием методов прямой и непрямой иммунофлюоресценции.

Результаты. Было установлено, что развитие ХСС приводит к значительной активации врожденной иммунной системы и сопровождается дисбалансом субпопуляций Т-хелперов в КАЛТ, приводит к увеличению отношения Tbet⁺/Gata3⁺ и уменьшению FoxP3⁺/Rorγt⁺ клеток, это свидетельствует о доминировании Th1- и Th17-дифференцировки в условиях ХСС и повышении уровня про-воспалительной сигнализации в кишечнике.

Кроме того, было показано, что на фоне хронического социального стресса развивается иммунопротеасомный дефект и стресс эндоплазматического ретикулума, который сопровождается однонаправленной тенденцией к увеличению общего количества LMP2⁺ лимфоцитов и уменьшению общего числа XBP1⁺ клеток, а также изменение концентрации LMP2 и XBP1 в иммунных клетках зависело от типа стресса.

Заключение. Проведенные исследования показывают, что хронический социальный стресс, вопреки классической парадигме стресса, существенно повышает уровень провоспалительной сигнализации в кишечнике и может быть триггером развития воспалительных и аутоиммунных заболеваний.

АНТИМИКРОБНЫЕ ПЕПТИДЫ БЕСПОЗВОНОЧНЫХ КАК РЕГУЛЯТОРЫ СИСТЕМЫ КОМПЛЕМЕНТА

Умяикова Е.С.¹, Берлов М.Н.^{1,2}, Овчинникова Т.В.³,
Кокряков В.Н.^{1,2}

¹ ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины»,
Санкт-Петербург, Россия

² Санкт-Петербургский государственный университет,
Санкт-Петербург, Россия

³ ФГБУН «Институт биоорганической химии», Москва,
Россия

Введение. Антимикробные пептиды (АМП) и система комплемента являются наиболее важными гуморальными факторами системы врожденного иммунитета. Колонизация и коэволюция этих факторов позволяют предположить существование тесного взаимодействия между различными АМП и белками комплемента. Такого рода взаимодействия могут играть роль в процессе регуляции иммунного ответа со стороны системы комплемента, однако в свою очередь не исключается и влияние белков системы комплемента на биологические свойства антимикробных пептидов.

До сих пор особенности взаимодействия АМП с системой комплемента остаются малоизученными. В литературе имеются разрозненные и противоречивые сведения о влиянии отдельных АМП на активацию комплемента, которые были получены с использованием принципиально различных подходов и разных моделей. Отдельный интерес представляют использование гетерологичных АМП с определенными структурными особенностями. Ранее нашей группой было показано взаимодействие рецепторной молекулы классического пути комплемента — C1q с ариенином-1 (Ar-1), АМП из целомотитов пескожила *Arenicola marina*, а также с протегрином-1 (PG-1), кателицидином свиньи. Третичная структура этих пептидов представляет собой антипараллельную бета-шпильку, стабилизированную дисульфидными связями. Возможно, подобная структура важна для взаимодействия этих пептидов с белком C1q. Потому представляет интерес изучение в этом аспекте и других АМП, имеющих сходную третичную структуру.

Цель и задачи. Изучить взаимодействие тахиплезина-1 (Tach 1), антимикробного пептида мечехвоста *Tachypleus tridentatus*, сходного по третичной структуре с Ar-1 и PG-1, с белком комплемента C1q и оценить влияние данного АМП на работу комплемента.

Материалы и методы. Белок-пептидные комплексы выявляли с помощью метода поверхностного плазмонного резонанса (ППР). Влияние Tach 1 на активацию комплемента оценивали с помощью антителозависимого гемолиза эритроцитов барана.

Результаты. Нам удалось выявить стабильные комплексы Tach 1 с белком комплемента C1q методом ППР.

По результатам оценки влияния Tach 1 на активность комплемента было показано, что данный пептид выступал в роли синергиста комплемента, и при добавлении пептида в концентрации 5 мкг/мл гемолиз эритроцитов усиливался. Важно отметить, что мы использовали пептиды в тех концентрациях, при которых они сами по себе не проявляют гемолитической активности. Ранее нами были получены данные о том, что структурно сходный с Tach 1 пептид Ar-1, напротив оказывал ингибирующее действие: в концентрации 20 мкг/мл полностью подавлял

активацию комплемента, а в концентрации 7 мкг/мл – частично.

Заключение. Согласно нашим данным, даже сходные по третичной структуре пептиды могут иметь разнонаправленный эффект на активацию комплемента. Это необходимо учитывать при использовании данных соединений для разработки на их основе регуляторов комплемента. Существует множество патологических состояний, связанных либо с гипо-, либо с гипер-активацией каскада комплемента, и потому важно продолжать изучение этих феноменов с перспективой создания препарата для лечения последствий дисрегуляции системы комплемента.

Работа поддержана грантом РФФИ для молодых ученых №16-34-00136 мол_а.

ВЛИЯНИЕ ФИНГОЛИМОДА НА ФУНКЦИОНАЛЬНУЮ АКТИВНОСТЬ АЛЬВЕОЛЯРНЫХ МАКРОФАГОВ ПРИ ЧЕРЕПНО-МОЗГОВОЙ ТРАВМЕ В ЭКСПЕРИМЕНТЕ

Уракова М.А., Брындина И.Г.

ФГБОУ ВПО «Ижевская государственная медицинская академия» Министерства здравоохранения РФ, Ижевск, Россия

Внимание ученых при изучении черепно-мозговой травмы (ЧМТ) традиционно привлекают процессы нарушения и восстановления мозговых функций. Вместе с тем, обнаружены структурно-морфологические изменения в легких и частое развитие пневмонии после травматического воздействия на головной мозг (Lopez-Aguilar J., Blanch L., 2015). Наряду с этим, в исследованиях последних лет обнаружено протекторное влияние финголимода, являющегося структурным аналогом сфингозин-1-фосфата, на ряд клеточных функций (усиление пролиферативных процессов, угнетение апоптоза), доказаны его иммуномодулирующие эффекты.

Цель. Изучение влияния финголимода на функциональную активность альвеолярных макрофагов при ЧМТ у крыс.

Экспериментальное исследование проведено на 45 крысах-самцах массой 180-200 г, в том числе 15 контрольных. ЧМТ воспроизводили ($n = 15$, 1-ая группа) под наркозом путем модели «свободного падающего груза» (Beaumont A. et al., 1999). На голове наркотизированных крыс, для равномерного распределения удара по черепной коробке, фиксировали металлическую пластинку диаметром 10 мм и толщиной 3 мм. Далее осуществляли механическую травму посредством опускания на теменно-затылочную область груза массой 50 г с высоты 50 см с площадью ударной части, равной 3,5 см². Остальным животным ($n = 15$, 2-ая группа) после моделирования ЧМТ однократно внутривнутрибрюшинно вводили финголимок по 0,1 мг/кг массы тела.

Спустя 14 суток у крыс получали бронхо-альвеолярные смывы (БАС). Из клеточной взвеси, полученной после центрифугирования БАС, готовили мазки, в которых определяли эндотелиальную цитограмму. Для оценки поглотительной активности альвеолярных макрофагов подсчитывали фагоцитарный индекс (ФИ) – процент фагоцитирующих клеток, и фагоцитарное число (ФЧ) – среднее число объектов фагоцитоза (дрожжей), поглощенное одной клеткой спустя 30 и 120 минут инкубации. При сопоставлении ФЧ после 30-минутной и 120-минут-

ной инкубации подсчитывали индекс завершенности фагоцитоза.

В ходе экспериментальных исследований было выявлено, что ЧМТ сопровождалась увеличением количества макрофагов и снижением доли лимфоцитов в БАС ($P < 0,05$). ЧМТ в условиях введения финголимода вызывала еще более выраженное уменьшение лимфоцитов ($P < 0,05$), при этом не оказывая существенного влияния на содержание альвеолярных макрофагов ($P > 0,05$). Повидимому, наблюдаемое уменьшение лимфоцитов в БАС вызвано блокадой выхода лимфоцитов из лимфоидных тканей путем действия финголимода на сфингозин-фосфатные рецепторы I типа.

Фагоцитарная активность альвеолярных макрофагов при ЧМТ характеризовалась снижением ФИ на 30-ой и 120-ой минуте инкубации ($P < 0,05$). Одновременно наблюдалось уменьшение среднего количества объектов фагоцитоза, поглощенное клеткой как через 30, так и через 120 минут ($P < 0,05$). Введение финголимода не вызывало изменений ФИ и ФЧ, выявленных при ЧМТ без дополнительного воздействия ($P > 0,05$). Индекс завершенности фагоцитоза был снижен в условиях травматического повреждения головного мозга ($P < 0,05$), но не отличался от контрольных значений при сочетании ЧМТ с введением финголимода ($P > 0,05$).

Таким образом, введение финголимода на фоне ЧМТ изменяет клеточный состав БАС в сторону уменьшения лимфоцитов. При этом сохраняется вызванное травмой мозга уменьшение фагоцитарной активности альвеолярных макрофагов, однако частично восстанавливается их обезвреживающая активность в отношении поглощенных объектов. Полученные результаты доказывают местное иммуномодулирующее действие финголимода, наряду с его вовлечением в регуляцию системных иммунных механизмов.

УЧАСТИЕ ЛИМФОЦИТАРНОГО ФОСФАТАЗА-АССОЦИИРОВАННОГО ФОСФОПРОТЕИНА В АКТИВАЦИИ ЛИМФОЦИТОВ

Филатов А.В., Круглова Н.А., Мешкова Т.Д., Мазуров Д.В.

ГНИ «Институт иммунологии» ФМБА России, Москва, Россия

Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

В лимфоцитах фосфатаза CD45 контролирует уровень фосфорилирования ряда рецепторов и сигнальных молекул и таким образом является важным регулятором активации иммунокомпетентных клеток. Однако какие молекулы управляют активностью самой CD45, остается невыясненным. На роль регулятора претендует лимфоцитарный фосфатаза-ассоциированный фосфопротеин (LPAF). Этот небольшой трансмембранный белок образует надмолекулярный комплекс с CD45, а также с корепептором CD4 и киназой Lck. В самых последних работах было показано, что белок LPAF может влиять на пролиферацию и выживаемость В-лимфоцитов (Kleiman et al., 2015). Также было обнаружено, что белок LPAF кооперирует с продуктом гена c-myc в процессе злокачественной трансформации пре-В-клеток (Wolf et al., 2016). Все это указывает на важную роль белка LPAF в регуляции кле-

точных процессов. Мы предполагаем, что функция белка LPAR может быть раскрыта путем изучения фосфорилирования этой молекулы.

Используя направленный мутагенез и масс-спектрометрический анализ, нами были идентифицированы сайты фосфорилирования LPAR. Информация о фосфо-мотивах белка LPAR была использована для синтеза соответствующих фосфопептидов и получения на их основе антител против обнаруженных фосфосайтов. Полученные фосфо-специфические антитела подтвердили идентифицированные нами сайты фосфорилирования и позволили изучить кинетику фосфорилирования/дефосфорилирования LPAR в ответ на физиологические стимулы. Нами было обнаружено, что при активации лимфоцитов под действием антитела ОКТЗ, направленного против антиген-специфического рецептора TCR, происходит быстрое дефосфорилирование Ser-99 и Ser-172, вслед за которым наблюдалось более медленное фосфорилирование Ser-163. Фосфорилирование Ser-153 оставалось неизменным и не зависело от внешних стимулов. Воздействие форболмирилата, который является активатором протеин киназы C, приводило к аналогичной цепочке событий. Нокаут киназы Lck отменял действие антитела ОКТЗ, но не форболмирилата. Было проведено сравнение изменений статуса фосфорилирования LPAR с кинетикой активации различных киназ. Эти эксперименты вместе с ингибиторным анализом указали на возможные киназы, которые находятся в сигнальных путях upstream и downstream от белка LPAR. Анализ мотивов белка LPAR показал, что казеин киназы типа I и II, а также MAP киназы могут принимать участие в фосфорилировании белка LPAR. Полученные данные позволяют перейти к изучению роли белка LPAR при конкретных аутоиммунных и онкологических заболеваниях.

ИЗУЧЕНИЕ ХЕМОТАКСИСА ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК НА ПРИМЕРЕ ЛИНИИ K562 И КЛЕТОК МИЕЛОМОНОБЛАСТНОГО ЛЕЙКОЗА

Филина А.Б.¹, Свитич О.А.¹, Амму Ю.И.¹,
Голеньков А.К.², Клинушкина Е.Ф.², Зверев В.В.¹

¹ ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова», Москва, Россия

² ГБУЗ МО «Московский областной научно-исследовательский клинический институт им. М.Ф. Владимирского», Москва, Россия

Введение. Смертность от онкологических заболеваний стоит на втором месте после летальности от заболеваний сердечно-сосудистой системы. Одной из проблем в развитии злокачественных новообразований является метастазирование опухолевых клеток. Последние десятилетия изучается роль хемотаксиса в метастазировании опухолевых клеток, а также участие TLRs в опухолеобразовании. Однако, несмотря на большое количество работ, направленных на изучение вышеописанных факторов, до сих пор не изучалось влияние активации TLRs на хемотаксис. Таким образом, целью данной работы — изучить спонтанный и индуцированный лигандами TLRs и CXCL12 хемотаксис K562 и клеток миеломонобластного лейкоза.

Цель и задачи. Изучить спонтанный хемотаксис МНК, выделенных от здоровых доноров и выделенных от

пациентов с миеломонобластным лейкозом, а также клеток опухолевой линии K562; изучить индуцированный хемотаксис лигандами TLRs и CXCL12 вышеописанных клеток; сравнить показатели спонтанного и индуцированного хемотаксиса клеток.

Материалы и методы. В качестве исследуемого материала использовалась культура клеток хронической миелогенной лейкемией линии K562 (предоставлена лабораторией экспериментальной иммунологии ФГБНУ НИИВС им.И.И. Мечникова), а также МНК, выделенные от здоровых доноров и пациентов с миеломонобластным лейкозом (пациенты отделения клинической гематологии и иммунотерапии ГБУЗ МО МОНИКИ им. М.Ф. Владимирского). В качестве хемоаттрактантов использовались следующие синтетические лиганды DNA_lig (ccg-gtc-cac-aag-ggg-ggc-ca) и RNA_lig (ccg-agg-aug-cga-ggc-uug-uu), последовательности которых были ранее получены Лабжиновым П.А. в лаборатории молекулярной иммунологии ФГБНУ НИИВС им. И.И. Мечникова. Использовался человеческий рекомбинантный хемоаттрактант CXCL12 (ThermoFisher, США). Для изучения хемотаксиса клеток использовали камеру Бойдена 96 – Well Filtration Plate Multiscreen TM – MIC с размером пор 8 мкм (фирма Millipore). Исследование хемотаксиса проводили в динамике через 10, 60 мин и через сутки с использованием вышеперечисленных лигандов. В качестве контроля использовали среду RPMI-1640 без глутамин (ПанЭко, РФ). Статистический анализ проводили с использованием компьютерной статистической программы BioStat 2009 5.8.3.0, а также программы Microsoft Excel 97-2003.

Результаты. Динамика хемотаксиса МНК пациентов с миеломонобластным лейкозом и клеток K562 по направлению к CXCL12 статистически значимо не отличалась. Показано, что CXCL12-опосредованный хемотаксис МНК пациентов через 60 минут и через 24 часа достоверно увеличивалась относительно контроля (в 2,4 раза). Миграция МНК здоровых доноров по направлению к CXCL12 была достоверно выше контроля через 60 минут и 24 часа в 1,3 и 1,6 раз, соответственно. Миграция МНК здоровых доноров по направлению к CXCL12 была в 1,7 и 1,5 раз выше миграции к DNA_lig и RNA_lig через 60 минут и 24 часа соответственно. Миграция МНК здоровых доноров относительно DNA_lig и RNA_lig не отличалась достоверно друг от друга, но была ниже, чем в контроле в 2 и 1,7 раза через 10 минут и 24 часа соответственно.

Заключение. По результатам проведенного исследования можно сказать, что хемотаксис по направлению к DNA_lig и RNA_lig значительно ниже, чем в контроле, что может говорить о супрессорной функции этих лигандов на миграцию. Миграция опухолевых клеток (линии K562) и клетки миеломонобластного лейкоза по направлению к CXCL12 была в несколько раз ниже, чем индуцированная миграция здоровых клеток. Таким образом, миграция опухолевых клеток к CXCL12 значительно снижена относительно миграции МНК здоровых доноров: причины по которым миграция опухолевых клеток снижена планируется изучать в дальнейшем путем исследования экспрессии факторов врожденного иммунитета, в том числе хемокинов и их рецепторов.

РЕГУЛЯТОРНЫЙ РЕВМАТОИДНЫЙ ФАКТОР ПРЕДОТВРАЩАЕТ РАЗВИТИЕ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО АТЕРОСКЛЕРОЗА, ВЫЗВАННОГО ИММУНИЗАЦИЕЙ НАТИВНЫМИ ЛИПОПРОТЕИНАМИ

Фомина К.В., Конорюкова А.А., Кузина М.А.,
Касимова Г.С., Богданова К.В.

ФГБОУ ВО «Удмуртский государственный университет», Ижевск, Россия

В настоящее время механизм, приводящий к развитию атеросклероза, до конца не ясен. В исследованиях, проведенных нами ранее, было показано, что однократная иммунизация крыс Wistar нативными липопротеинами низкой плотности (нЛПНП) человека или нативными липопротеинами высокой плотности (нЛПВП) человека вызывает висцеральное ожирение и изменения в стенке аорты типичные для ранних стадий атерогенеза. Однако в ответ на иммунизацию нЛПНП или нЛПВП изменения в стенке аорты и висцеральное ожирение развиваются не у всех исследованных крыс. Также нами был выявлен новый фактор регуляции аутореактивности, предотвращающий развитие экспериментально-вызванных аутоиммунных заболеваний, таких как коллаген-индуцированный артрит, аутоиммунный энцефаломиелит. Исследование специфичности данного фактора регуляции показало, что он представляет собой популяцию антиидиотипических антител специфичных к антигенсвязывающим участкам антигенраспознающих рецепторов аутореактивных лимфоцитов. От других антиидиотипических антител фактор регуляции отличается наличием общего паратопа специфичного к неоантигенным детерминантам шарнирной области IgG и его Fc-фрагментов. Учитывая данные о специфичности и принцип метода выявления нового фактора регуляции аутореактивности, последний был отнесен к антителам подобным ревматоидному фактору. Чтобы отличать от классического ревматоидного фактора, ассоциированного с артритом, ревматоидный фактор, сдерживающий развитие аутоиммунных заболеваний, получил название регуляторный ревматоидный фактор (регРФ). Мы предполагаем, что регРФ является универсальным фактором негативной регуляции аутореактивности и участвует в регуляции атерогенных и адипогенных иммунных реакций, предотвращая развитие атеросклероза и висцерального ожирения. Если гипотеза верна, то крысы, продуцирующие регРФ в ответ на иммунизацию нЛПНП и нЛПВП, окажутся устойчивы к атеросклерозу.

Тринадцать крыс Wistar было иммунизировано нЛПНП (Sigma), семнадцать – нЛПВП человека (Kalen Biomedical) в составе неполного адьюванта Фрейнда (НАФ) (Sigma), однократно, в дозе 200 мкг. Контрольные крысы (n = 16) получили инъекцию НАФ. Титр антител против нЛПНП и нЛПВП человека определяли методом ИФА. Для выявления эпикардиального жира сердце окрашивали суданом III. Оценивали содержание внутриабдоминального жира. Титр регРФ определяли методом агглютинации танзированных эритроцитов, нагруженных гомологичным иммуноглобулином G. Идиотип-антиидиотипические взаимодействия между популяцией регРФ и антителами к нативным липопротеинам определяли методом конкурентного ИФА.

В ответ на иммунизацию нЛПНП атеросклероз развивался у 60% крыс, в ответ на иммунизацию нЛПВП – у 80% крыс. В качестве критерия наличия или отсутствия у крыс атеросклероза было использовано висцеральное ожирение (появление эпикардиального жира и увеличение объема

внутриабдоминального жира), так как висцеральное ожирение является надежным маркером атеросклероза у человека и легко визуализируется. Наличие висцерального ожирения было ассоциировано с ранними атеросклеротическими изменениями стенки аорты. Обнаружено, что у крыс, иммунизированных нЛПНП либо нЛПВП и оказавшихся устойчивыми к развитию висцерального ожирения и атеросклероза, продукции антител к липопротеинам предшествует продукция регРФ. У животных, у которых развилось висцеральное ожирение и выявлены изменения в стенке аорты, повышения уровня регРФ в период индукции иммунного ответа (т.е. в течение 14 дней после иммунизации) не обнаружено. Сравнительный анализ уровня регРФ у устойчивых и чувствительных к атеросклерозу крыс выявил достоверно высокий его уровень на 7 день после иммунизации нЛПНП и на 14 день после иммунизации нЛПВП у устойчивых крыс по сравнению с чувствительными (Манна–Уитни тест, $p < 0,05$). Также обнаружено, что регРФ, полученный от устойчивых к атеросклерозу крыс, иммунизированных нЛПНП, является антиидиотипическими антителами по отношению к антителам против нЛПНП, а регРФ, полученный от крыс, иммунизированных нЛПВП, – антиидиотипическими антителами к антителам против нЛПВП. Таким образом, продукция регРФ в ответ на иммунизацию крыс нативными липопротеинами ассоциирована с устойчивостью крыс к развитию экспериментального атеросклероза и висцерального ожирения. Отсутствие повышения уровня регРФ в ответ на иммунизацию крыс нативными липопротеинами может служить предиктором экспериментального атерогенеза и развития висцерального ожирения у крыс, иммунизированных нативными липопротеинами.

ЭЛЕКТРОПОРАЦИЯ ДЕНДРИТНЫХ КЛЕТОК ПЛАЗМИДОЙ, КОДИРУЮЩЕЙ ИММУНОРЕГУЛЯТОРНЫЙ ЦИТОКИН IL-10

Хантакова Ю.Н., Курилин В.В., Максютов А.З.,
Сенников С.В.

Научно-исследовательский институт
фундаментальной и клинической иммунологии,
Новосибирск, Россия

Вслед за успехами в клеточной иммунотерапии онкологических заболеваний стали разрабатываться клеточные подходы коррекции посттрансплантационных нарушений, требующих пожизненного применения иммуносупрессивной терапии. Среди них особое место занимает использование толерогенных дендритных клеток (ДК). Однако при введении в организм в условия трансплантации такие ДК теряют толерогенные свойства и дифференцируются в зрелые клетки, способствующие развитию эффекторного иммунного ответа. Для поддержания толерантности необходимо получение стабильной популяции толерогенных ДК. Одним из подходов является использование иммунорегуляторных цитокинов, таких как IL-10, однако при введении в организм, в условиях дефицита IL-10, может происходить их созревание. В отличие от использования белков, электропорация (ЭП) ДК ДНК-конструкциями, кодирующими цитокины, будет обеспечивать стабильное толерогенное состояние ДК. Целью данной работы является оптимизация протокола ЭП ДК плазмидой, кодирующей rIL-10, а также опре-

деление зависимости эффективности ЭП от различных показателей.

Материалы и методы. В работе использовали мышей линии C57Bl/6, в возрасте от 2 до 6 месяцев, которые были предоставлены ИЦИГ (г. Новосибирск). Костный мозг (КМ) для исследования получали из бедренных костей животного. Для получения культуры ДК клетки КМ культивировали в концентрации 1 млн/мл полной среды RPMI-1640, при добавлении 20 нг/мл GM-CSF и 20 нг/мл IL-4. Через 48 часов проводилась смена полной среды с повторным добавлением цитокинов без предварительного осаждения клеток. Для проведения электропорации ДК дважды отмывали раствором PBS и разводили до концентрации 20 млн/мл в холодном растворе OptiMem. Для проведения процедуры ЭП к 100 мкл ДК, добавляли необходимое количество плазмидной ДНК-конструкции, И проводили ЭП при различных вольтажах и длительности импульса. Сразу после ЭП клетки культивировали в полной среде в 48-луночном планшете в концентрации 1-2 млн/мл. Оценка эффективности электропорации проводилась по определению GFP-позитивных клеток. Жизнеспособность клеток оценивалась по включению пропидия йодида. Определение эффективности электропорации ДК целевой плазмидой rMax-IL-10 проводилось по оценке внутриклеточного содержания IL-10 в ДК спустя 3 часа после ЭП при добавлении монензина и брэфелдина А, а также по продукции цитокина методом ИФА. Статистическая обработка результатов производилась при помощи программы GraphPadPrism 6.0.

Результаты. Показано, что использование 60 мкг/мл ДНК-плазмиды при силе импульса в 250 V и длине импульса в 5 мс являются оптимальными условиями, обеспечивающими повышение количества GFP-позитивных клеток при минимальной общей клеточной гибели. Определение условий культивирования после ЭП показало оптимальное распределение и количество пролиферирующих клеток наблюдается при культивировании клеток в концентрации 2 млн/мл в смеси полной и кондиционной среды, в соотношении 1:1, при добавлении 20 нг/мл GM-CSF и 20 нг/мл IL-4. Использование данного протокола приводит к увеличению количества GFP-позитивных клеток до 50% при количестве жизнеспособных клеток 95%. Увеличение времени (10 ms и 15 ms) приводит к достоверному снижению количества GFP-позитивных клеток. Для оценки эффективности трансфекции проводили определение внутриклеточной продукции IL-10 после трансфекции плазмидой rMaxIL-10. Было показано достоверное увеличение количества CD11c⁺IL-10⁺ ДК по сравнению с контрольными группами, что указывает на эффективность разработанного протокола. Также методом ИФА показана дозозависимая продукция IL-10 при электропорации ДК разными количествами плазмиды, кодирующей rMIL-10. По сравнению с ДК без электропорации, которые продуцируют IL-10 в очень низких концентрациях (4 пг/мл), даже минимальное количество плазмидной ДНК (1 мкг/мл) способствует увеличению продукции IL-10 в 224 раза (до 896 пг/мл), а использование больших концентраций плазмиды приводит к гиперпродукции IL-10 до 45 нг/мл. В течение 3 дней не наблюдается увеличение продукции IL-10, что говорит о пике продукции цитокина уже спустя 24 часа после электропорации.

Выводы. Разработанный протокол электропорации позволяет эффективно проводить трансфекцию дендритных клеток, обеспечивающую высокий уровень продукции целевого цитокина rMIL-10 при высокой жизнеспособности клеток. Полученные результаты могут быть использованы в дальнейшем для индукции толерогенных ДК со стабильным фенотипом, которые станут основой для разработки подходов к индукции трансплантационной толерантности в условиях *ex vivo*.

Работа поддержана РФФ. Соглашение. № 16-15-00086 от 11.01.2016.

ВЛИЯНИЕ ЦИТОКИНОВ НА ИНТЕНСИВНОСТЬ ЭКСПРЕССИИ ХЕМОКИНОВОГО РЕЦЕПТОРА CD184 ЕСТЕСТВЕННЫМИ КИЛЛЕРАМИ

Хохлова Е.В.¹, Михайлова В.А.^{1,2}, Соколов Д.И.^{1,2}, Сельков С.А.¹

¹ ФГБНУ «Научно-исследовательский институт акушерства, гинекологии и репродуктологии им. Д.О. Отта», Санкт-Петербург, Россия

² ГБОУ ВПО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург, Россия

Введение. Трансэндотелиальная миграция НК-клеток периферической крови является основным механизмом их пополнения в децидуальной ткани, где они играют важную роль с самых ранних этапов беременности. В миграции НК-клеток в децидуальную оболочку важную роль играет CXCL12 (SDF-1, stromal cell-derived factor-1). SDF-1 – хемоаттрактант, который продуцируется клетками трофобласта и способствует привлечению НК-клеток в зону маточно-плацентарного контакта за счет связывания с рецептором CXCR4 (CD184), экспрессированным на НК-клетках. **Целью** исследования являлся анализ экспрессии рецептора CD184 клетками линии NK-92MI в присутствии цитокинов (TNF α , TGF- β).

Материалы и методы. Клетки линии NK-92MI культивировали с цитокинами TNF α , TGF- β в течение 24 часов при 37 °C в атмосфере 100% влажности, 5% CO₂, после чего окрашивали антителами против рецептора CD184 (BD, США). Экспрессию рецептора оценивали при помощи проточного цитофлюориметра FACS Canto II (BD, США). Статистический анализ проводили в компьютерной программе Statistica 10, используя параметрический критерий Стьюдента ($p < 0,05$).

Результаты. Установлено, что при обработке клеток противовоспалительным цитокином TGF- β интенсивность экспрессии рецептора CD184 снижалась во всех исследуемых концентрациях по сравнению со спонтанным уровнем. Обработка провоспалительным цитокином TNF α увеличивала интенсивность экспрессии рецептора CD184 по сравнению со спонтанным уровнем.

Выводы. Провоспалительный цитокин TNF α и противовоспалительный цитокин TGF- β изменяют чувствительность НК-клетки к воздействию SDF-1 за счет изменения интенсивности экспрессии рецептора CD184, тем самым регулируя миграцию НК-клеток в ткани.

РОЛЬ АУТОАНТИТЕЛ К CD4 И РЕГУЛЯТОРНОГО РЕВМАТОИДНОГО ФАКТОРА В ГИБЕЛИ CD4⁺ ЛИМФОЦИТОВ У КРЫС, ИММУНИЗИРОВАННЫХ gp120 ВИЧ-1

Храмова Т.В., Снигирёв А.Я., Ворожцова В.С., Вайтина А.М.

ФГБОУ ВО «Удмуртский государственный университет», Ижевск, Россия
БУЗ УР «Удмуртский республиканский центр по профилактике и борьбе со СПИДом и инфекционными заболеваниями», Ижевск, Россия

Введение. Сегодня одним из центральных вопросов патогенеза ВИЧ-инфекции, сдерживающим разработку эффективных способов лечения и предотвращения заболевания, является выяснение механизма гибели неинфицированных ВИЧ CD4⁺ лимфоцитов, которые составляют основную массу гибнущих клеток при ВИЧ-инфекции. Предложенные в разное время гипотезы, объясняющие механизм истощения незараженных CD4⁺ лимфоцитов при ВИЧ-инфекции, либо не получили экспериментального подтверждения, либо не считаются полностью доказанными. Наиболее непротиворечивой и обоснованной является аутоиммунная гипотеза. Согласно аутоиммунной гипотезе СПИДа, основной причиной гибели незараженных ВИЧ CD4⁺-лимфоцитов, является аутоиммунная реакция против CD4.

Цель. Исследование роли аутоантител к CD4, продукцию которых индуцирует gp120 ВИЧ, в гибели CD4⁺ лимфоцитов.

Материалы и методы. Крысы Wistar (n = 12) иммунизировали рекомбинантным gp120 гликопротеином ВИЧ-1 (ACROBiosystems) однократно в/к в составе неполного адьюванта Фрейнда (НАФ) в дозе 20 мкг. Уровень антител к gp120 ВИЧ-1 в плазме крови крыс определяли методом иммуноферментного анализа. Определяли уровень антител к рекомбинантному CD4 человека и уровень аутоантител к рекомбинантному CD4 крыс методом иммуноферментного анализа. Кроме того, определяли аутоантитела к CD4⁺ лимфоцитам крыс с помощью разработанного нами метода конкурентного иммуноцитохимического анализа. Количество CD4⁺ лимфоцитов в периферической крови крыс измеряли методом проточной цитофлуориметрии, используя меченые FITC антитела к CD4 крыс. Также определяли титр регуляторного ревматоидного фактора методом агглютинации танализированных нагруженных гомологичным IgG эритроцитов.

Результаты. Обнаружено, что иммунизация gp120 ВИЧ-1 вызывает продукцию аутоантител к CD4 у всех иммунизированных крыс, в то время как у контрольных крыс, получивших инъекцию НАФ, аутоантител к CD4 не обнаружено. Показано, что аутоантитела к CD4 связываются как с рекомбинантным CD4 крыс, так и с мембраносвязанным CD4 крыс. Индуцированные иммунизацией gp120 аутоантитела к CD4 крысы способны связывать также рекомбинантный CD4 человека. Полученные факты служат подтверждением того, что gp120 ВИЧ-1 способен не только индуцировать продукцию антител к gp120, но и вызывать активацию аутореактивных лимфоцитов, продуцирующих аутоантитела, перекрестно реагирующие с CD4 крысы и человека.

У иммунизированных крыс, продуцирующих аутоантитела к CD4, наблюдалось транзиторное снижение количества CD4⁺ лимфоцитов. Непосредственной связи

между уровнем антител к CD4⁺ лимфоцитам и количеством CD4⁺ клеток обнаружено не было. Однако снижение числа CD4⁺ лимфоцитов совпадало со спонтанным повышением уровня регуляторного ревматоидного фактора в крови. Обнаружена обратная корреляция между уровнем регуляторного ревматоидного фактора и количеством CD4⁺ лимфоцитов в крови крыс, продуцирующих аутоантитела к CD4, в ответ на иммунизацию gp120 гликопротеином ВИЧ-1 ($r = -0,73$, $p < 0,05$). Регуляторный ревматоидный фактор был исследован у крыс с целью выяснения его роли в регуляции иммунного ответа к gp120, так как ранее на нескольких экспериментальных моделях было показано его участие в предотвращении развития аутоиммунных заболеваний (Beduleva, 2015). В регуляции иммунного ответа против gp120 ВИЧ регуляторный ревматоидный фактор участия не принимает.

Заключение. Таким образом, гибель CD4⁺ лимфоцитов у крыс, иммунизированных gp120 ВИЧ-1, является результатом совместного действия аутоантител к CD4 и регуляторного ревматоидного фактора. Мы предполагаем, что аутоантитела к CD4 вызывают активацию CD4⁺ лимфоцитов, что приводит к экспрессии на их поверхности активационных молекул, к которым специфичен регуляторный ревматоидный фактор. Связывание последнего ведет к гибели CD4⁺ лимфоцитов. Данное предположение не противоречит ранее обнаруженному факту, что регуляторный ревматоидный фактор убивает активированные CD4⁺ лимфоциты. Вопрос о том, какие именно молекулы активации на CD4⁺ лимфоцитах являются лигандом для регуляторного ревматоидного фактора, является предметом дальнейших исследований.

РЕАКЦИЯ ТУЧНЫХ КЛЕТОК В СЕМЕННИКАХ НА РАЗЛИЧНЫЕ ВИДЫ ИХ ПОВРЕЖДЕНИЯ

Храмцова Ю.С., Тюменцева Н.В., Юшков Б.Г., Бухарина А.Ю.

Институт иммунологии и физиологии УрО РАН, УрФУ, Екатеринбург, Россия

Тучные клетки являются неотъемлемым компонентом иммунного микроокружения семенников, а именно важными посредниками в управлении Т-клеточной толерантностью. Они также выделяют ряд цитокинов, участвующих в физиологическом апоптозе зародышевых клеток, происходящем в нормальном яичке. Вместе с тем, выявляется отчетливая отрицательная корреляция между такими показателями, как число мастоцитов и состояние сперматогенеза. Вырабатывая провоспалительные медиаторы, они могут усугублять воспалительные процессы, происходящие в яичке после повреждения. Причины, которые могут привести к повреждению семенников, самые разнообразные. Однако остается невыясненным вопрос о типе реакции тучных клеток в ответ на разные виды повреждения яичек. В связи с этим целью работы является изучение реакции тучных клеток в семенниках на различные виды его повреждения.

Материалы и методы. Исследование проведено на 35 половозрелых крысах-самцах линии Wistar, которые были разделены на 4 группы: 1) интактные; 2) животные с проколом левого семенника иглой диаметром 3 мм; 3) животные с тупой травмой левого семенника путем его сдавления; 4) животные с экспериментальной моделью варикоцеле. Семенники исследовали на 7 и 30 сутки после воздействия. Для подсчета тучных клеток в тканях срезы

окрашивали толуидиновым синим. Подсчет проводили на единицу площади с пересчетом на 1 мм². Для определения синтетической активности вычисляли средний гистохимический коэффициент. Для оценки функциональной активности рассчитывали индекс дегрануляции. Значимость различий при статистической обработке экспериментального материала оценивали по непараметрическому критерию Манна–Уитни.

Результаты. На 7 сутки после прокола не наблюдается каких-либо достоверных изменений в количестве тучных клеток в поврежденном семеннике, но к 30-м суткам происходит снижение этого показателя по сравнению с интактной группой. При этом синтетическая активность тучных клеток на все сроки эксперимента остается высокой. Индекс дегрануляции на 7 сутки растет, а на 30 возвращается к показателю интактных животных. После тупой травмы на 7 сутки возрастает количество тучных клеток, а на 30 сутки происходит снижение количества мастоцитов до уровня интактных животных. Вместе с количеством тучных клеток достоверно возрастает и их синтетическая активность на 7 сутки. На 30 сутки после воздействия уровень синтетической активности тучных клеток возвращается к показателям интактных животных. Индекс дегрануляции увеличивается на 7 сутки и остается таким же и на 30 сутки после тупой травмы. На 7 сутки после формирования экспериментальной модели варикоцеле не отмечается достоверных изменений в количестве тучных клеток семенников, но уже на 30 сутки данный показатель резко уменьшается. Оценивая функциональные показатели тучных клеток, отмечаем повышение их синтетической активности на 7 сутки. К 30-м суткам картина становится противоположной, и синтетическая активность резко снижается и становится достоверно меньше интактных показателей. Индекс дегрануляции тучных клеток, в свою очередь, также значительно повышается к 7-м суткам и резко падает ниже интактного показателя к 30-м.

Заключение. Таким образом, гетерогенная тучноклеточная популяция совершенно по-разному реагирует на различные повреждения семенника как количественными, так и функциональными изменениями. Можно предположить, что тучные клетки обладают разнонаправленным действием в зависимости от срока воздействия. Так, на ранние сроки мастоциты способствуют развитию воспаления и косвенно вызывают деструкцию органа, а на поздние сроки играют иммунорегуляторную роль в репаративных процессах в семеннике. Следовательно, повышение количества мастоцитов на ранние сроки может свидетельствовать об ухудшении картины восстановления, а на поздние сроки, наоборот, их повышенное количество указывает на положительный прогноз восстановления.

АКТИВАЦИЯ ТОЛЛ-ПОДОБНЫХ РЕЦЕПТОРОВ ВАКЦИНАМИ ПРОТИВ ГРИППА (IN VITRO)

Хромова Е.А., Сходова С.А., Столпникова В.Н.,
Кукина О.М., Ахматова Н.К., Костинов М.П.

ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин
и сывороток им. И.И. Мечникова», Москва, Россия

Введение. Грипп остается актуальной проблемой здравоохранения на протяжении последних десятилетий. Единственным способом эффективного ограничения распространения гриппа и уменьшения тяжести его последствий является широкий охват вакцинацией групп

риска населения. Наибольшее применение, в силу своей высокой эффективности и малой реактогенности, получили инактивированные иммуноадьювантные вакцины против гриппа. В механизме формирования поствакцинального иммунитета в настоящее время отсутствует информация о сравнительной активности адьювантных и безадьювантных вакцин и их влиянии на врожденные эффекторы иммунной системы на молекулярно-клеточном уровне.

Известно, что к факторам врожденного иммунитета относятся предрасполагающие в организме до контакта с патогеном механизмы защиты, предназначенные для предупреждения проникновения возбудителя и для запуска раннего воспалительного ответа Toll-подобные рецепторы (TLRs), которые распознают широкий спектр патоген-ассоциированных молекулярных структур (PRRs).

Цель и задачи. Изучение влияния вакцин против гриппа на содержание клеток с экспрессией TLRs *in vitro*.

Материалы и методы. Экспрессию TLRs на МЛПК определяли методом проточной цитометрии с применением МАТ к TLR-2, TLR-3, TLR-4, TLR-5, TLR-8, TLR-9 (eBioscience, США) с использованием проточного цитометра FC-500 (Beckman Coulter, США).

Исследуемые вакцины: Инфлювак – субъединичная вакцина, Ваксигрип – сплит-вакцина. Данные вакцины содержат 2 штамма вируса гриппа А по 15 мкг, один штамм вируса гриппа В – 15 мкг. Гриппол плюс – полимер-субъединичная иммуноадьювантная вакцина. Содержит 2 штамма вируса гриппа А по 5 мкг, один штамм вируса гриппа В – 5 мкг и иммуноадьювант Полиоксидоний – 500 мкг.

Результаты. Изучение влияния данных вакцин на содержание гранулоцитов с экспрессией TLRs выявило существенное повышение экспрессии со стороны TLR-5, TLR-9. Более активным стимулирующим действием на TLR-3⁺ клетки обладала субъединичная вакцина (увеличение содержания в 7,2 раза), несколько ниже была активность иммуноадьювантной вакцины (увеличение в 5,1 раз), сплит-вакцина повышала экспрессию в 3,7 раз. Известно, что TLR-8 распознает одноцепочечные РНК вирусов и является специфическим рецептором для распознавания вируса гриппа. Максимально активирующим влиянием обладала субъединичная вакцина (увеличение в 5,7 раз), при этом активность сплит-вакцины была несколько ниже (в 4,1 раза). Это, вероятно, связано с костимулирующим влиянием на экспрессию TLR-8 Полиоксидония в составе иммуноадьювантной вакцины и воздействием поверхностных и внутренних вирусных белков в составе сплит-вакцины. В отношении активации лимфоцитов, экспрессирующих TLRs, было выявлено максимально активирующее влияние на эндосомальные рецепторы сплит-вакцины. Под ее воздействием увеличивалась экспрессия TLR-9 в 4 раза, безадьювантная и адьювантная субъединичные вакцины оказывали меньшее стимулирующее влияние (увеличение в 2,8 и 3,3 раза соответственно). При инкубации МЛПК со сплит-вакциной происходило увеличение численности клеток с экспрессией TLR-8 в 10 раз. Иммуноадьювантная вакцина проявляла большую активность по сравнению с другими вакцинами только в отношении количества лимфоцитов с экспрессией TLR-4, что можно объяснить опосредованным лиганд-рецепторным взаимодействием. Также отмечено увеличение TLR-5–экспрессирующих моноцитов в 4,7 раз при стимуляции субъединичной вакциной. Выявлено, что иммуноадьювантная вакцина яв-

ляется единственной активирующей вакциной в отношении TLR-3⁺ моноцитов. Все вакцины являлись мощными стимуляторами TLR-9, увеличивая экспрессию в среднем в 5 раз. Примечательным явился факт, что иммуноадьювантная (в 2 раза) и сплит-вакцина (в 4 раза) статически значимо повышали содержание клеток с экспрессией эндосомального рецептора TLR-8.

Вывод. Все исследуемые вакцины обладали иммуностимулирующим действием в отношении эффекторов врожденного иммунитета, так как в культуре МЛПК индуцировали нарастание численности TLRs-экспрессирующих клеток. Более сильным потенциалом обладала иммуноадьювантная вакцина, повышающая численность клеток с рецепторами распознавания в 1,3-6,8 раз.

СУЩЕСТВУЮТ ЛИ В-ЛИМФОЦИТЫ, ТОРМОЗЯЩИЕ ОБРАЗОВАНИЕ АНТИТЕЛ И ИММУНОГЛОБУЛИНОВ?

Чернышова И.Н., Гаврилова М.В., Комарова Л.В., Снегирева Н.А.

ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова», Москва, Россия

Введение. Гуморальный иммунный ответ у животных и человека развивается по известным правилам. При первичном иммунном ответе максимальное число антитело-продуцентов (АОК) в селезенке мышей выявляется на 4-5-е сутки после введения антигена (АГ); на 6-7-е сутки происходит их снижение почти до исходного уровня. Помимо образования АОК, введение АГ приводит также к поликлональной активации В-лимфоцитов, причем оба процесса развиваются параллельно. Известно, что при ответе на Т-зависимые АГ важную роль в регуляции гуморального ответа играют Т-лимфоциты. В то же время о клетках, участвующих в регуляции синтеза/секреции специфических и поликлональных иммуноглобулинов (ИГ) при ответе на Т-независимые АГ 2-го типа (ТН-2 АГ), известно сравнительно немного. В последние годы появились данные о В-клетках, обладающих регуляторными, в частности супрессорными, свойствами. Эти клетки получили название Breg. Свойства и функциональная активность Breg изучались, главным образом, на модели воспалительных и аутоиммунных процессов. Регуляторная (супрессорная) активность таких клеток обусловлена секрецией IL-10. Для Breg характерна экспрессия CD1d и CD5, а также IgM и CD24. При этом CD23 на них отсутствует. Роль этих клеток в гуморальном иммунном ответе практически не изучалась. Часть Breg принадлежит к популяции В-1 лимфоцитов. Поскольку В-1 клетки отвечают, в основном, на ТН-2 АГ, изучение роли Breg в регуляции ответа на ТН-2 АГ представляется весьма актуальным.

Цель и задачи. Проверка предположения об участии IL-10-продуцирующих В-клеток в регуляции (угнетении) образования АГ и поликлональных ИГ при ответе на ТН-2 АГ. Определение динамики образования IL-10-секретирующих В-клеток и сопоставление ее с динамикой образования АОК и иммуноглобулин-продуцентов (ИГОК) при иммунизации мышей ТН-2 АГ.

Материалы и методы. Опыты проводили на мышах линии СВА. Мышей иммунизировали ТН-2 АГ – альфа (1→3) декстраном в дозе 5 мкг/мышь. Клетки селезенки получали на 1, 4-7-е сутки после введения АГ. Затем методом иммуномагнитной сепарации выделяли CD19⁺В-

клетки (чистота 95-97%) и в них определяли число АОК, ИГОК и IL-10-секретирующих клеток (IL-10⁺В) методом ELISPOT. В этих же клетках оценивали содержание Breg клеток с фенотипом CD5⁺CD1d^{hi}CD19⁺ и IL-10⁺В-клеток с использованием набора Regulatory B cell isolation kit методом проточной цитометрии на Beckman Coulter EPICS XL.

Результаты. Установлено, что наибольшее число АОК (2458/млн В-клеток против 188/млн в норме) наблюдалось на 4-е сутки; к 6 суткам отмечалось снижение их содержания примерно в 2 раза, к 7 суткам – в 3 раза по сравнению с пиковым значением. Сходным образом изменялось содержание ИГОК в селезенке иммунизированных мышей.

Динамика образования IL-10⁺В-клеток в селезенке отличалась от таковой для АОК и ИГОК. Методом ELISPOT наибольшее увеличение IL-10-секретирующих В-клеток (примерно на 30% по сравнению с нормой) выявлено на 5-е сутки, на 7-й день их содержание возвращалось к исходному уровню. Методом проточной цитометрии установлена сходная динамика: на 6-й день после иммунизации содержание IL-10⁺В-клеток возрастало примерно в 2,5 раза и в последующие дни снижалось. Нужно отметить, что содержание IL-10⁺В-клеток в селезенке было незначительным и составляло 0,4-0,5%.

Выявление Breg клеток с фенотипом CD5⁺CD1d^{hi}CD19⁺ (основные продуценты IL-10) показало, что количество таких клеток в селезенке мышей в норме составляло 0,3-0,8%. После иммунизации декстраном содержание CD5⁺CD1d^{hi}CD19⁺ клеток на 4-й день возрастало примерно в 1,5 раза и сохранялось на таком уровне до 6 дня, после чего происходило снижение их числа. Возрастание уровня CD5⁺CD1d^{hi}CD19⁺ клеток на 4-е сутки, можно объяснить тем, что В1-клетки, имеющие такой фенотип, являются основной популяцией, отвечающей на ТН-2 АГ, и также достигают максимума на 4-5-е сутки, как указано выше.

Заключение. Выявлены различия в динамике образования АОК, ИГОК и IL-10⁺В-клеток в селезенке мышей при иммунизации мышей ТН-2 АГ декстраном: снижение числа АОК и ИГОК коррелировало с увеличением содержания IL-10⁺В-клеток и Breg с фенотипом CD5⁺CD1d^{hi}CD19⁺. Полученные данные свидетельствуют о возможном участии Breg клеток, продуцирующих IL-10, в регуляции (угнетении) иммунного ответа на ТН-2 АГ.

ПРОТЕАСОМЫ ПЕЧЕНИ В РАННЕМ ОНТОГЕНЕЗЕ И РАЗВИТИИ ТОЛЕРАНТНОСТИ К ТРАНСПЛАНТАТУ

Шарова Н.П.¹, Карпова Я.Д.¹, Божок Г.А.², Астахова Т.М.¹, Ерохов П.А.¹, Алабедалькариим Н.М.², Устиченко В.Д.², Легач Е.И.², Люпина Ю.В.¹

¹ ФГБУН «Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова» РАН, Москва, Россия

² Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, Харьков, Украина

Введение. Протеасомы, мультисубъединичные протеазы, регулируют многочисленные клеточные процессы, расщепляя или подвергая процессингу компоненты сигнальных путей, транскрипционные факторы и другие белки. Особые формы протеасом млекопитающих, иммунные протеасомы, содержащие протеолитические субъединицы LMP2, LMP10 и/или LMP7, обеспечивают

образование биологически активных пептидов, важных для межклеточных взаимодействий и инициации иммунных реакций. Полноразмерные белки и полипептиды средней длины проникают в протеолитическую камеру протеасом с помощью активаторов PA700 и PA28 соответственно. Разнообразие функций протеасом обусловлено уникальным сочетанием протеолитических субъединиц и активаторов в их структуре. В этой связи большой интерес представляет изучение множественных форм протеасом печени, играющей роль первичного лимфоидного органа в эмбриональный период, обладающей клетками врожденного иммунитета и в то же время обеспечивающей развитие толерантности к пищевым и другим чужеродным антигенам.

Цель и задачи. Изучение изменений в пуле протеасом печени крыс в раннем онтогенезе и развитии толерантности к трансплантату. Исследование экспрессии иммунных субъединиц LMP7 и LMP2 и активаторов PA700 и PA28 протеасом печени крыс в раннем развитии, а также у половозрелых животных с прижившимся и отторгнутым трансплантатом ткани эндокринных желез соответственно после индукции донор-специфической толерантности (ДСТ) и в ее отсутствие.

Материалы и методы. Протеасомы печени в раннем онтогенезе изучались на крысах Вистар. ДСТ индуцировали у крыс Август введением в портальную вену печени спленцитов донора – крыс Вистар. Аллотрансплантацию ткани яичников или щитовидной железы проводили под капсулу почки. Экспрессию иммунных субъединиц и активаторов протеасом в экстрактах печени оценивали методом Вестерн-блоттинга. Экспрессию иммунных субъединиц протеасом в клетках печени исследовали методами иммуногистохимии и проточной цитометрии.

Результаты. Обнаружен волнообразный характер экспрессии иммунных субъединиц LMP7 и LMP2 в раннем развитии печени. Иммунные субъединицы выявляются в печени крысы, начиная с 16-х эмбриональных суток (Э16). На Э18 их число удваивается и существенно снижается через несколько дней после рождения, что связано с присутствием Т- и В-лимфоцитов, обогащенных иммунными протеасомами, в печени в этот период и последующей миграцией их во вторичные лимфоидные органы. К 21-м постнатальным суткам уровень иммунных протеасом в печени снова возрастает за счет повышения их экспрессии в гепатоцитах, что сопровождается увеличением количества молекул МНС класса I. Очевидно, в этот период гепатоциты приобретают способность образовывать антигенные эпитопы для молекул МНС класса I с помощью иммунных протеасом и «показывать» свою дефектность клеткам иммунной системы в случае инфицирования или синтеза мутантных белков. Кроме того, в раннем онтогенезе крыс и у взрослых животных в печени выявляются обогащенные иммунными протеасомами АПК – клетки Купфера и эндотелиальные клетки синусоидов, которые обеспечивают развитие толерантности. В экспериментах по трансплантации ткани эндокринных желез показано, что у животных с индукцией ДСТ и прижившимися трансплантатами значительно увеличивается число мононуклеарных клеток печени, экспрессирующих субъединицу LMP2, но не LMP7, по сравнению с контрольными группами животных. Обнаружено уменьшение уровня активатора PA700 и увеличение уровня активатора PA28 в печени крыс с прижившимся трансплантатом после индукции

ДСТ по сравнению с таковыми у контрольных крыс и у животных с отторгнутым трансплантатом.

Заключение. Полученные результаты указывают на то, что иммунные функции печени в раннем онтогенезе и у взрослых животных связаны с иммунными протеасомами, содержащими субъединицы LMP2 и LMP7. Развитие толерантности к трансплантату, очевидно, обеспечивается АПК печени, экспрессирующими иммунные протеасомы с субъединицей LMP2 и активатором PA28. Этот тип иммунных протеасом может служить новым маркером приживления трансплантатов.

Работа поддержана РФФИ (гранты № 15-04-03494-а и № 16-34-60083-мол_а_дк).

ВЛИЯНИЕ КАТЕХОЛАМИНОВ НА ПРОДУКЦИЮ ИНТЕРЛЕЙКИНА-1 β НЕЙТРОФИЛАМИ *IN VITRO*

Швыдченко И.Н.¹, Гурьянова С.В.^{1,2},
Тамбовцева А.А.¹, Сергеев С.В.¹, Гронская А.С.¹

¹ Кубанский государственный университет физической культуры, спорта и туризма, Краснодар, Россия

² Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва, Россия

Нейтрофилы играют важную роль в реакциях острой фазы воспаления и обеспечивают противомикробную защиту организма. Кроме того, благодаря своей способности секретировать широкий спектр хемокинов и цитокинов при активации, нейтрофилы вовлечены в регуляцию врожденного и адаптивного иммунного ответа. В настоящее время существуют данные о способности нейтрофилов секретировать цитокины при различных условиях, не связанных с патологией, в частности под воздействием физического стресса, однако механизмы этой секреции недостаточно исследованы, несмотря на то, что физические нагрузки являются повседневым фактором в жизни каждого человека. Катехоламины адреналин и норадреналин, высвобождаются при физическом стрессе, могут регулировать иммунный и воспалительный ответ, модулировать цитокиновую сеть (Bergmann and Sauter, 2002). Эти эффекты во многом зависят от типа стимулируемого адренорецептора и их локализации. Адренорецепторы были обнаружены на всех иммунных клетках, в том числе и на нейтрофилах (Scanzano and Cosentino, 2015).

Целью настоящей работы было исследование иммуномодулирующего влияния катехоламинов адреналина и норадреналина, а также селективного агониста β -адренорецепторов изопротеренола на продукцию нейтрофилами интерлейкина 1 β (IL-1 β) *in vitro*. В исследовании приняли участие 20 здоровых добровольцев обоего пола (средний возраст 19,4 \pm 0,26 лет). Все участники были полностью информированы о целях исследования и подписали добровольное информированное согласие на участие в нем. Нейтрофилы выделяли на градиенте плотности (1,077) с последующим осаждением эритроцитов декстраном и осмотическим лизисом. Проводили автоматический подсчет выделенных клеток с одновременной оценкой их жизнеспособности (не менее 90-98%) методом эксклюзии трипанового синего. Нейтрофилы ресуспендировали в среде RPMI 1640 с L-глутамином и 25 мМ HEPES с добавлением 10% эмбриональной телячьей сыворотки и 1% пенициллина-стрептомицина; инкубировали при 37 °C в 5% CO₂ 20 часов в концентрации 1 \times 10⁶ клеток/мл/лунку

в стерильных культуральных 12-луночных планшетах с добавлением 100 мкл Дюльбекко фосфатно-солевого раствора (DPBS) – спонтанная секреция, или 100 мкл различных индукторов: адреналина ((-) –Epinephrine) в конечной концентрации 0,01, 0,1 и 1 мкМ; норадреналина ((-) –Norepinephrine) в конечной концентрации 0,001, 0,1 и 1 мкМ; изопротеренола ((plus-minus) – Isoproterenol Hydrochloride) – 0,1 мкМ; селективного антагониста β -адренорецепторов пропранолола (DL-Propranolol) – 1 мкМ, формил пептида (fMLP) – 10 мкМ. Все вещества получены из SIGMA-ALDRICH (Германия). При использовании нескольких веществ их вносили через 30 мин инкубации в следующей последовательности: fMLP-антагонист-агонист. Через 20 ч инкубации клетки осаждали центрифугированием, супернатант отбирали и замораживали (-20 °С) до проведения исследования. Концентрацию IL-1 β в супернатанте определяли методом ИФА с использованием коммерческих тест-наборов, согласно инструкции производителя (ООО «Цитокин», Россия). Чувствительность метода составляла для IL-1 β – 6,25 пг/мл. Статистическая обработка полученных результатов проводилась с использованием пакета прикладных программ STATISTICA 7 (StatSoft Inc., США). Центральные тенденции и дисперсии количественных признаков описывали медианой и интерквартильным интервалом (Q₁-Q₃). Сравнение групп по количественным признакам проводили с использованием непараметрического W-критерия Вилкоксона для выборки парных измерений. Наблюдаемые различия считались не случайными при P < 0,05. Установлено, что адреналин в дозе 0,1 мкМ в 2 раза стимулирует секрецию IL-1 β нейтрофилами здоровых доноров (34,10; 19,75-61,60 пг/мл/10⁶кл. в сравнении с 15,1; 6,3-24,65 пг/мл/10⁶кл. при спонтанной секреции, P = 0,012). Норадреналин и изопротеренон не оказывают статистически значимого влияния. Выявлены тенденции к усилению продукции IL-1 β нейтрофилами при совместном действии адреналина в дозе 1 мкМ и хемотаксического пептида fMLP (P = 0,0679). Этот эффект лишь частично отменяется селективным антагонистом β -адренорецепторов пропранололом, что, наряду с отсутствием влияния изопротеренола, может свидетельствовать о β -адренонезависимом стимулирующем действии адреналина на секрецию IL-1 β нейтрофилами.

Работа поддержана РФФИ и Министерством образования и науки Краснодарского края, проект № 16-44-230391p_a.

ПОЛИМОРФИЗМ МОЛЕКУЛЫ H2-A КЛАССА II ГЛАВНОГО КОМПЛЕКСА ГИСТОСОВМЕСТИМОСТИ ОПРЕДЕЛЯЕТ ПРОТЕКТИВНЫЙ ОТВЕТ ХОЗЯИНА ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ТУБЕРКУЛЕЗНОЙ ИНФЕКЦИИ

**Шепелькова Г.С., Майоров К.Б., Логунова Н.Н.,
Апт А.С.**

*ФГБНУ «Центральный научно-исследовательский
институт туберкулеза», Москва, Россия*

Туберкулез (ТБ) – одна из самых распространенных и опасных инфекционных болезней в мире. Показано, что чувствительность к ТБ контролируется многими полиморфными генами. Как профессиональные антиген презентующие клетки макрофаги экспрессируют на своей мембране молекулы класса II МНС. Ассоци-

ация чувствительности к ТБ с полиморфизмом МНС показана как у мыши, так и у человека. Ранее в нашей лаборатории был идентифицирован один из генов, контролирующей восприимчивость к ТБ – ген H2-Ab1, кодирующий бета-цепь классической молекулы МНС Класса II. Рекомбинантные линии мышей, выведенные в нашей лаборатории и различающиеся только по аллелям этого гена, проявляют различную чувствительность к инфекции. У мышей, несущих аллель от чувствительной родительской линии I/St (H2-Aj), развивается тяжелая патология легких с выраженным воспалением и продукцией большого количества воспалительных цитокинов, в отличие от резистентных к ТБ мышей несущих аллель H2-Ab. Однако роль полиморфизма H2-A молекулы в развитии чувствительности/резистентности к ТБ до сих пор неясна. Неизвестно, зависит ли взаимодействие эффекторных Т лимфоцитов CD4 с инфицированными макрофагами от вариантов аллеля H2-A.

Цель. Определение роли полиморфизма H2-A в формировании протективного ответа хозяина при экспериментальной ТБ инфекции.

Материалы и методы. Макрофаги перитонеального экссудата полученные от линий мышей отличающихся по аллелям гена H2-A: C57BL/6 (B6), несущие аллель H2-Ab, B6.I-9.3.19.8, несущие аллель H2-Aj и гибридов первого поколения F1(B6xH2-9.3.19.8) (F1), экспрессирующие оба аллеля гена H2-A. Т-лимфоциты CD4 выделяли из суспензии спленоцитов мышей F1, инфицированных вирулентным штаммом *M. tuberculosis*, методом селекции в магнитном поле. Жизнеспособность микобактерий в смешанных культурах оценивали по избирательному включению последними 5,6-[³H]-урацила. Поверхностный фенотип лимфоцитов определяли методом проточной цитофлуориметрии. Предрасположенность клеток к апоптозу смотрели по активности каспазы-3 и каспазы-7.

Результаты. Ранее в нашей лаборатории было показано, что активация бактериостатической функции макрофагов Т-лимфоцитами CD4 зависит от молекулы МНС класса II. Для выявления роли H2-A полиморфизма была использована модель активации инфицированных макрофагов с разными аллельными вариантами молекулы H2-A иммунными Т-лимфоцитами CD4. Макрофаги перитонеального экссудата мышей линий B6, B6.I-9.3.19.8 и F1 культивировали в присутствии вирулентного штамма микобактерий с Т-лимфоцитами CD4 мышей F1. Через 72 часа культивирования клеток оценивали активацию макрофагов под действием Т-лимфоцитов по степени подавления роста микобактерий в культурах, содержащих Т-лимфоциты, по сравнению с культурами не содержащими Т-лимфоциты. Т-лимфоциты CD4 усиливали способность B6 (H2-Ab) и F1(H2-AbAj) макрофагов ингибировать рост микобактерий и не влияли на бактериостатическую функцию макрофагов B6.I-9.3.19.8 (H2-Aj), то есть существует доминирование H2-Ab молекулы над молекулой H2-Aj при активации инфицированных макрофагов Т-клетками CD4.

Известно, что молекулы МНС класса II определяют не только презентацию антигенов при развитии адаптивного иммунного ответа, но и важны в селекции Т-клеток CD4⁺. Определение количества Т-лимфоцитов в лимфоидной ткани показало, что молекула H2-Aj плохо селекционирует Т-клетки CD4⁺. Наличие единственной селекционирующей молекулы класса II H2-Aj (линия 9.3.19.8) при-

водит к резкому дефициту клеток CD4⁺ в лимфоидной ткани, хотя экспрессия единственной молекулы другого аллеля, (H2-Ab у мышей В6) достаточна для поддержания стандартного соотношения CD4:CD8. Также установлено, что CD4 клетки мышей несущих аллель H2-Aj сильнее подвержены апоптозу.

Заключение. Показано преимущество аллеля H2-Ab при активации бактериостатической функции макрофагов иммунными Т-лимфоцитами CD4, а также влияние данного аллеля на селекцию Т-лимфоцитов CD4 и предрасположенность последних к апоптозу.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (грант № 15-04-02002).

ОПРЕДЕЛЕНИЕ МИКРОБИЦИДНОГО ЭФФЕКТА СЕКРЕТОРНЫХ ПРОДУКТОВ НЕЙТРОФИЛОВ, ПРЕДВАРИТЕЛЬНО ПОДВЕРГШИХСЯ МОДЕЛИРОВАННОМУ НИЗКОИНТЕНСИВНОМУ ЭЛЕКТРОМАГНИТНОМУ ИЗЛУЧЕНИЮ, В ОТНОШЕНИИ LACTOBACILLUS PLANTARUM, BIFIDOBACTERIUM BIFIDUM, STAPHYLOCOCCUS AUREUS, ESCHERICHIA COLI

Шишкова Ю.С., Даровских С.Н., Вильданова О.Р.

ФГБОУ ВО «Южно-Уральский государственный медицинский университет», Челябинск, Россия
ФГАОУ ВО «Южно-Уральский государственный университет (Национальный исследовательский университет)», Челябинск, Россия

Введение. Нейтрофильные гранулоциты являются быстрореагирующими клетками на изменение условий внешней среды. В последнее время все чаще обсуждается проблема электромагнитного загрязнения окружающей среды, его негативное влияние на организм человека, и прежде всего на иммунную систему, а также рассматривается позитивная роль космического ЭМИ в сохранении здоровья человечества. До настоящего момента окончательно не ясно, каким образом влияет техногенное ЭМИ (излучение от линий электропередачи, сотовых телефонов, компьютерной техники и т. д.) и космическое (природное) электромагнитное излучение (ЭМИ) на микробицидный потенциал секреторных продуктов.

Цель. Оценить микробицидный эффект секреторных продуктов нейтрофилов, предварительно подвергшихся

моделированному низкоинтенсивному ЭМИ, аналогичному природному и техногенному, в отношении представителей резидентной и факультативной микрофлоры слизистых оболочек тела человека.

Задачи. 1. Оценить микробицидный эффект секреторных продуктов нейтрофилов, предварительно подвергшихся моделированному низкоинтенсивному электромагнитному излучению, аналогичному техногенному, в отношении *L. plantarum*, *B. bifidum*, *S. aureus*, *E. coli*. 2. Определить микробицидный эффект секреторных продуктов нейтрофилов, предварительно подвергшихся моделированному низкоинтенсивному ЭМИ, аналогичному природному, в отношении *L. plantarum*, *B. bifidum*, *S. aureus*, *E. coli*.

Материалы и методы. Для получения секреторных продуктов использовали чистую фракцию нейтрофилов, выделенных на двойном градиенте фиколла-урографина из периферической венозной крови условно здоровых доноров (n = 28), предварительно облученных моделированным низкоинтенсивным электромагнитным излучением, генерируемым аппаратом АИМТ-1. Микробицидный эффект секреторных продуктов изучали фотометрическим методом, учет результатов проводили с помощью фотометра Anthos 2020. Результаты были статистически обработаны с помощью компьютерной программы Past_2.17с.

Результаты. В результате проведенных исследований определили, что секреторные продукты интактных нейтрофилов обладали микробицидным эффектом по отношению ко всем тестируемым культурам. Микробицидный эффект секреторных продуктов нейтрофилов, предварительно подвергшихся моделированному ЭМИ, аналогичному природному и техногенному, оставался стабильным по отношению к грампозитивным микроорганизмам *L. plantarum*, *B. bifidum*, *S. aureus*. По отношению к *E. coli* микробицидный эффект секреторных продуктов нейтрофилов, предварительно подвергшихся моделированному низкоинтенсивному ЭМИ, аналогичному природному и техногенному, значительно возрастал (табл.).

Заключение. Таким образом, низкоинтенсивное ЭМИ, аналогичное природному и техногенному, повышает бактерицидность секреторных продуктов нейтрофилов по отношению к грамотрицательной микрофлоре и не влияет на антибактериальную способность по отношению к грампозитивной флоре.

ТАБЛИЦА. ПОКАЗАТЕЛИ ОПТИЧЕСКОЙ ПЛОТНОСТИ ТЕСТИРУЕМОГО ОБРАЗЦА (К ТЕЗИСАМ ШИШКОВОЙ Ю.С. И ДР.)

	Супернатант неактивированных нейтрофилов	Супернатант нейтрофилов, предварительно подвергшихся моделированному низкоинтенсивному ЭМИ, аналогичному техногенному	Супернатант нейтрофилов, предварительно подвергшихся моделированному низкоинтенсивному ЭМИ, аналогичному природному
1	2	3	4
<i>Lactobacillus plantarum</i>	0,295 (0,259-0,332)	0,282 (0,243-0,322)	0,299 (0,262-0,328)
<i>Bifidobacterium bifidum</i>	0,237 (0,198-0,266)	0,316 (0,253-0,345)	0,259 (0,235-0,285)
<i>Staphylococcus aureus</i>	0,532 (0,408-0,630)	0,591 (0,467-0,653)	0,476 (0,263-0,700)
<i>Escherichia coli</i>	0,334 (0,308-0,373)	0,235 (0,200-0,264) p ₂₋₃ = 0,00001	0,269 (0,235-0,334) p ₂₋₄ = 0,0007

ВЛИЯНИЕ АГОНИСТА ОБЩЕЙ β -РЕЦЕПТОРНОЙ СУБЪЕДИНИЦЫ (β cR) РЕЦЕПТОРА ЭРИТРОПОЭТИНА НА ИММУНОЛОГИЧЕСКИЕ ПОКАЗАТЕЛИ КРОВИ МЫШЕЙ C57BL/6

Щелчкова Н.А.^{1,2}, Ермин К.В.^{1,2}, Логинов П.А.¹,
Глявина М.М.^{1,2}, Жученко М.³, Мухина И.В.^{1,2}

¹ Нижегородская государственная медицинская академия Министерства здравоохранения РФ, Нижний Новгород, Россия

² Нижегородский университет им. Н.И. Лобачевского, Нижний Новгород, Россия

³ ООО «Фармапарк», Москва, Россия

Благодаря ряду исследований в области тканепротекции, собрана сумма доказательств, позволяющих рассматривать общую β -рецепторную субъединицу (β cR) рецептора грануляцитарно-макрофагального фактора роста, рецептора интерлейкина-3 и рецептора интерлейкина-5 и мономерную форму рецептора эритропоэтина (EPOR) как части гетеромерного рецепторного комплекса, запускающего каскад молекулярных событий, приводящий к цитопротективным эффектам в ряде тканей. С другой стороны, в разных клеточных типах, экспрессирующих указанные молекулы, сигнальный каскад и его последствия могут различаться. В связи с обнаружением слабой экспрессии EPOR на поверхности лимфоцитов возникает вопрос об участии рецепторного комплекса EPOR- β cR в иммуномодуляторных механизмах.

Цель. Изучить влияние агониста негематопоэтической формы рецептора EPOR (EPOR- β cR) на основе рекомбинантного человеческого эритропоэтина на иммунологические показатели крови мышей линии C57BL/6 в динамике.

Исследования проводились на мышях линии C57BL/6. Мышам пятикратно вводили внутривенно раствор рекомбинантного полипептида «карбамилированный дарбэпоэтин (CdEPO) (ООО «Фармапарк», Россия) в течение 24 ч в дозе 50 мкг/кг. В качестве контрольной группы использовали интактных животных ($n = 8$). Иммунограммы животных оценивали на 4, 10, 20 дни после введения препарата ($n = 5$ в каждой точке). Анализ проводили на цитофлюориметре FACS Canto II (BD Biosciences). Гейтирование популяции лимфоцитов проводилось по графику CD45 PerCP/SSC с последующим выделением гейта для NK-клеток (NK1.1⁺), для В-лимфоцитов (CD3⁺CD19⁺), субпопуляций Т-хелперов и цитотоксических Т-клеток (CD3⁺CD4⁺ и CD3⁺CD8⁺), субпопуляций активированных В-лимфоцитов (CD19⁺CD25⁺) и активированных Т-лимфоцитов (CD3⁺CD25⁺) на соответствующих графиках. Данные представлены как арифметические средние значения и стандартная ошибка среднего. Данные представлены как арифметические средние значения и стандартная ошибка среднего. Для оценки статистической значимости различий между контрольной и опытными группами использовали однофакторный дисперсионный анализ (ANOVA) с последующим применением критерия Тьюке и критерия Даннетта. Различия признавались значимыми при $p \leq 0,05$.

В ходе исследования на 4-е сутки после введения животным CdEPO отмечалась тенденция роста доли активированных В-лимфоцитов (10,28±1,51%) в общей популяции В-лимфоцитов в крови относительно контрольного значения (5,8±0,57%). Эта тенденция сохранялась в последующих временных точках, на 20 сутки различия становились статистически значимыми (12,28±0,30%; $p = 0,0096$). Доли NK-клеток (3,65±0,3%) и активирован-

ных Т-лимфоцитов (3,24±0,22%) не претерпевали выраженных изменений (контрольные значения 5,85±0,55% и 3,73±0,5% соответственно).

На 10-е сутки было отмечено статистически значимое нарастание показателя пула NK-клеток (10,03±0,90%) и увеличение относительного содержания активированных Т-лимфоцитов (5,36±0,47%) в сравнении с контролем ($p = 0,035$ и $0,066$) и четвертыми сутками после введения ($p = 0,035$ и $0,047$). Значения обоих показателей сохранялись более высокими и в конечной фазе исследования (20 суток): доля CD25⁺Т-лимфоцитов (5,16±0,58%) и NK-клеток (9,09±1,77%).

Доля В- и Т-лимфоцитов в лимфоцитарной фракции, соотношение Т-киллеров и Т-хелперов колебались в пределах диапазона статистической значимости.

Таким образом, можно предполагать, что введение специфического агониста рецепторного комплекса EPOR- β cR мышам линии C57BL/6 вызвало повышение доли NK-клеток в составе общей лимфоцитарной фракции на 10 сутки после введения. Также отмечается рост доли CD25⁺В-клеток, наиболее выраженный на 20 сутки эксперимента.

Следовательно, стимуляция негематопоэтической гетеромерной формы рецептора эритропоэтина обладает некоторым иммуностропным действием на клеточное звено иммунитета, модальности которого при различных условиях и состояниях организма требуют дальнейшего изучения.

СИСТЕМНЫЕ ПРОЯВЛЕНИЯ МЕХАНИЗМОВ ИММУННОЙ ЗАЩИТЫ В ДИНАМИКЕ ФТОРИСТОЙ ИНТОКСИКАЦИИ ОРГАНИЗМА (ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ)

Ядыкина Т.К., Михайлова Н.Н., Жукова А.Г.,
Горохова Л.Г., Казизкая А.С., Бугаева М.С.

ФГБНУ «Научно-исследовательский институт комплексных проблем гигиены и профессиональных заболеваний», Новокузнецк, Россия

Алюминиевая промышленность – одна из наиболее перспективных и быстроразвивающихся отраслей цветной металлургии, однако длительное воздействие на организм рабочих соединений фтора в условиях электролитической технологии производства алюминия, несет потенциальную опасность для здоровья, являясь определяющим фактором развития хронической фтористой интоксикации (ХФИ) – профессионального флюороза.

Изменение направленности высокоспецифичных иммунных реакций, обеспечивающих адаптацию организма к длительной нагрузке фторидами, изучено недостаточно. Открытыми остаются системные иммунологические аспекты течения флюороза. Повреждение печени при ХФИ имеет иммунопосредованный характер, так как фторид-ион не обладает прямым цитопатическим действием на гепатоциты. Иммунное нарушение функциональной активности печени, индуцированное фтором, осуществляется посредством развития неспецифического хронического воспаления, обусловленного изменением иммунного статуса организма. Цель: изучить системные проявления механизмов иммунной защиты в динамике экспериментального флюороза.

Материалы и методы. Эксперимент проведен на белых нелинейных крысах-самцах массой 200 г, разделённых на 2 группы: контроль ($n = 20$); опыт ($n = 40$), с ХФИ (свободный доступ крыс к раствору NaF в концентрации 10 мг/л в течение 12 недель). Для изучения иммунного статуса ис-

следовали кровь из хвостовой вены через 1, 3 суток и 1, 3, 6, 9, 12 недель. Стандартными методами определяли: общее число лейкоцитов; цитокинов (TNF α , IL-4, IL-6, IL-8, IL-10); уровень гаптоглобина (Hr), церулоплазмينا (Cr); иммуноглобулинов (Ig) А, М, G; адренкортикотропный гормон (АКТГ). В отдельной серии забирали образцы печени для гистологического анализа тканей. Уровень HSP73 (heat shock protein 73), HOx-2 (heme oxygenase-2) в печени определяли вестерн-блоттингом. Данные обрабатывали в Statistica 6.0.

Результаты. Ранние сроки (1, 3 недели) эксперимента сопровождались активацией клеточного иммунитета (лейкоцитоз на фоне сниженного числа лимфоцитов и увеличенного – моноцитов) с последующим запуском цитокинового каскада (гиперпродукция TNF α на фоне снижения уровня противовоспалительных цитокинов [IL-4, IL-10]). Уровень IL-6, 8 сохранялся в физиологических пределах. Двукратное повышение содержания АКТГ уже на 3-и сутки эксперимента выполняющей регулируемую роль в ранней индукции TNF α , повлекшей за собой активацию синтеза Cr в печени, что следует рассматривать как защитную реакцию организма, направленную на предупреждение «окислительного стресса». Пусковым механизмом, инициирующим формирование процессов клеточной адаптации, является скачок синтеза белка с защитной функцией HSP73 и повышение в 2 раза уровня HOx-2 в печени на фоне гиперфункции ее ретикулоэндотелиальной системы на 1-й неделе. Усиление фагоцитарной функции системы органоспецифических макрофагов – клеток Купфера с 3-й недели, свидетельствовало об активном их участии в организации иммунного ответа. Выявленное утолщение базальной мембраны капилляров, связано с накоплением в ней иммунных комплексов и Ig. Адаптивным признаком гиперфункции на данном сроке также являлось скопление белка в цитоплазме, обусловленное компенсаторной активацией внутридолькового кровотока в печени, о чем свидетельствовало расширение синусоидальных капилляров и увеличение их массы, что обеспечивало лабильность метаболизма клеток печени. На начальной стадии развития ХФИ данные механизмы выступают первой линией защиты организма, что подтверждалось и отсутствием изменений в гуморальном звене иммунитета. Уровень Ig сохранялся в пределах физиологической нормы до 6-й недели. С 6-й недели запускался воспалительный процесс, развитие которого подтверждалось полуторакратным повышением уровня нейтрофилов и индукцией синтеза П-6 на фоне достоверно высокого значения TNF α , свидетельствуя о развитии системного воспалительного ответа. Снижение иммунной реактивности с 9-й недели подтверждалось достоверным снижением уровня IgA, М, G; лейкопенией на фоне лимфоцитоза, высоким уровнем Hr, доминированием воспалительной реакции и необратимыми деструктивными изменениями в печени, сопровождающимися скоплением лейкоцитов в синусоидах и развитием некроза к 12-й неделе ХФИ.

Заключение. Экспериментальные исследования показали, что начальная (1-3 недели) ответная реакция организма на фтористую агрессию характеризуется компенсаторной реакцией печени, активацией клеточного звена иммунитета, индукцией синтеза цитокинов; защитных белков в гепатоцитах. Шестая неделя сопровождается снижением иммунной реактивности, приобретающей к 9-й неделе патологический характер, протекающий с нарушением баланса между регенерацией гепатоцитов и их локальным воспалением, обусловленным снижением иммунной защиты организма.

ИССЛЕДОВАНИЕ СТАНДАРТНОСТИ МЕТОДИКИ ОПРЕДЕЛЕНИЯ СПЕЦИФИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ ЭРИТРОПОЭТИНА НА НОРМОЦИТЕМИЧЕСКИХ МЫШАХ

Яковлев А.К., Алпатова Н.А., Постнова Е.Л., Симутенко Л.В., Батуашвили Т.А.

ФГБУ «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

Введение. За последние два десятилетия препараты рчЭПО использованы более чем у миллиона пациентов, их применение устраняет анемический синдром, уменьшает потребность в гемотранфузиях, снижает инфекционную заболеваемость, повышает качество жизни. Данные средства входят в «Перечень жизненно необходимых и важнейших лекарственных препаратов для медицинского применения». В РФ зарегистрировано 13 препаратов рчЭПО (6 отечественных и 7 зарубежных). Импортное замещение в здравоохранении обострило вопросы повышения эффективности и безопасности лекарств. Отсутствие ОФС на эритропоэтин в ГФ РФ привело к различию в методиках определения качества препаратов у отечественных производителей, так как у препаратов рчЭПО, зарегистрированных в начале 1990-х гг., показатели качества и нормативные требования, отличаются от поступающих на регистрацию в настоящее время. По требованиям ЕФ основной показатель качества – специфическую активность определяют по стимуляции эритропоэза, у мышей линии В6D2F1, подсчитывая количество ретикулоцитов с помощью проточной цитометрии. Рассчитанная активность должна быть не менее 80 и не более 125 %, доверительный интервал (P = 0,95) – не менее 64 и не более 156%. В РФ определение проводят на линейных и беспородных мышах, подсчитывая ретикулоциты с помощью проточной цитометрии и световой микроскопии. Требования к полученным результатам ограничиваются правильностью без учета их прецизионности, что влияет на точность. Условия, допускающие применение световой микроскопии, необходимы при разработке ОФС рчЭПО, гармонизированной с Европейской фармакопеей. Гармонизация с ЕФ позволит выйти на более высокий уровень контроля качества в соответствии с международными требованиями и повысить эффективность и безопасность лекарственных препаратов рчЭПО при клиническом применении.

Цель. Совершенствование и стандартизация методики определения специфической активности эритропоэтина для включения в ОФС ГФ РФ.

Задачи. 1) стандартизовать лабораторную модель определения активности эритропоэтина; 2) оценить правильность и прецизионность метода при подсчете ретикулоцитов проточной цитометрией и световой микроскопией; 3) изучить возможность гармонизации методик по показателям стандартности ЕФ.

Материалы и методы. Специфическую активность оценивали методом *in vivo* по стимуляции гемопоэза у мышей линий В6D2F1 и Balb/c, и беспородных в ответ на введение им в качестве испытуемого и стандартного образцов независимых разведений биологического референс препарата (BRP batch#3). Подсчет ретикулоцитов проводили на проточном цитофлуориметре (Navios, Beckman Coulter) и световом микроскопе (Axio Scope A1, Carl Zeiss). При выполнении работы учтены требования НД отечественных производителей и Европейской фар-

макопей. Данные статистически обработаны методом параллельных линий.

Результаты. При статистической обработке методом параллельных линий результатов экспериментов на беспородных мышах, выявлено несоответствие обязательным критериям параллельности и линейности. Результаты на мышах линий B6D2F1 и Balb/c статистически не отличались.

Правильность результатов при подсчете ретикулоцитов методом проточной цитометрии имеет смещение в пределах 1-8 %, световой микроскопии – 4-31%. Прецизионность результатов проточной цитометрии, в 2 раза выше, чем микроскопии. Доверительные интервалы рассчитанной активности, полученной подсчетом световым микроскопом, не соответствовали требованиям ЕФ.

Наличие обратной зависимости между величиной стандартного отклонения результатов и количеством подсчитанных клеток, свидетельствует о возможности повышения правильности и прецизионности результатов микроскопии путем увеличения количество подсчитываемых клеток.

Заключение. 1. Для определения специфической активности эритропоэтинов подходят линейные мыши. 2. Использование проточной цитометрии характеризуется высокой точностью и соответствует требованиям Европейской фармакопей. Результаты световой иммерсионной микроскопии обладают меньшей точностью и не соответствуют требованиям Европейской Фармакопей по доверительному интервалу. 3. В случае отсутствия проточного цитометра использование менее точной световой микроскопии требует отработки оптимальных условий (увеличения количества подсчитываемых клеток), что позволит соответствовать требованиям ЕФ, как по величине рассчитанной активности, так и по доверительному интервалу полученных результатов.

СРАВНИТЕЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА МИКРОВЕЗИКУЛ МАКРОФАГОВ ПЕРВОГО И ВТОРОГО ТИПА

Янковская А.А., Баторов Е.В., Шевела Е.Я.

ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии», Новосибирск, Россия

Введение. Макрофаги являются гетерогенной популяцией клеток, и в зависимости от условий активации и функций можно выделить «классические», или провоспалительные, M1 и «альтернативные», или противоспали-

тельные M2 макрофаги. Исследованиями последних лет продемонстрирована значительная роль микровезикул (Мв) в реализации биологических эффектов различных типов клеток, однако спектр и свойства Мв, продуцируемых различными типами макрофагов и, в частности, M2, которые активно участвуют в процессах иммуномодуляции и репарации, остается неизученным.

Цель. Охарактеризовать Мв, секретируемые M1 и M2 макрофагами.

Материалы и методы. Макрофаги первого и второго типа генерировали из прилипающей фракции мононуклеарных клеток периферической крови доноров при культивировании в присутствии GM-CSF, в условиях нормального и сниженного содержания ростовых факторов сыворотки. Продукцию Мв оценивали в 48-часовых супернатантах M1 и M2 макрофагов, стандартизованных по количеству клеток. Мв получали методом препаративного ступенчатого ультрацентрифугирования, окрашивали моноклональными антителами (CD206, CD11c, HLA-DR, B7H1) и анализировали при помощи проточной цитофлуориметрии.

Результаты. M1-специфичные Мв коэкспрессируют характерные для M1 макрофагов маркеры – CD11c и HLA-DR, а также общие с M2 поверхностные структуры – маннозный рецептор (CD206) и коингибиторную молекулу B7H1. В ответ на стимуляцию эндотоксином спектр Мв значимо не изменялся. Среди Мв, продуцируемых M2 макрофагами, обнаруживалось достоверно меньше CD11c⁺ Мв в сочетании с увеличением относительного количества CD206⁺ Мв и коэкспрессирующих HLA-DR⁺ и B7H1⁺ Мв. При стимуляции ЛПС спектр также достоверно не менялся.

Заключение. Полученные предварительные результаты могут свидетельствовать о том, что M1 и M2 макрофаги продуцируют – спонтанно и при стимуляции эндотоксином – определенный спектр микровезикул, соответствующий определенному функциональному фенотипу.

КОМПЛЕКСНЫЙ ВАКЦИННЫЙ ПРЕПАРАТ ПРОТИВ ГЕМОФИЛЬНОЙ ИНФЕКЦИИ

Ястребова Н.Е., Овечко Н.Н., Токарская М.М., Елкина С.И.

ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова» РАН, Москва, Россия

В настоящее время не существует вакцины, которая была бы эффективной в защите одновременно от кап-

ТАБЛИЦА. ОТНОСИТЕЛЬНОЕ СОДЕРЖАНИЕ МВ В НЕСТИМУЛИРОВАННЫХ И ЛПС-СТИМУЛИРОВАННЫХ 48-ЧАСОВЫХ СУПЕРНАТАНТАХ, СТАНДАРТИЗОВАННЫХ ПО КОЛИЧЕСТВУ M1 И M2 КЛЕТОК (К ТЕЗИСАМ ЯНКОВСКОЙ А.А. И ДР.)

Исследуемый антиген	M1		M2	
	0	ЛПС	0	ЛПС
CD11c	3,38	4,7	1,5*	1,57*
HLA-DR	14,0	28,6	14,1	18,3
CD206	16,7	23,8	23,1*	27,6
B7H1	31,7	30,2	28,9	33,3
HLA-DR+B7H1	25,7	25,8	43,95*	46,4*

Примечание. Представлены медианные значения данных, полученных в четырех экспериментах. * $p_w < 0,05$ – достоверные различия по сравнению с соответствующими показателями M1 макрофагов.

сульных и бескапсульных штаммов *H. influenzae*. Вместе с тем, распространенность, частота генерализации, тяжесть течения заболеваний и высокая летальность при инфекциях, обусловленных штаммами *H. influenzae*, принадлежащими к разным серотипам, требует разработки именно такого средства специфической профилактики. Известно, что комбинация углеводных составляющих с гликолипидами или гликопротеин-связывающим белком, может усилить захват антигена, гуморальный и клеточный ответы и развитие биологической памяти у взрослых и детей. Вероятно, углеводсодержащие препараты, такие как капсульный полисахарид, липоолигосахарид и препараты, содержащие белки наружной мембраны, а также комбинация некоторых из них, могут служить для создания нового вакцинного препарата, направленного на профилактику гемофильной инфекции, обусловленной как капсульными, так и бескапсульными штаммами *H. influenzae*. В связи с этим целью настоящего исследования явилось получение низкотоксичного препарата с высокой перекрестной активностью.

Объектами исследования являлись полученные из капсульного и бескапсульных штаммов препараты липоолигосахаридов, белоксодержащие препараты, препараты, полученные при смешивании их с капсульным полисахаридом, их иммуногенная и протективная активность.

Нами на основании данных субтипирования, выбран наиболее распространенный в популяции бескапсульный штамм *H. influenzae* – № 45 NTНi. Липоолигосахарид (ЛОС) 45NTНi обладал наиболее выраженной специфической и перекрестной активностью и в дозе 1 мкг защищал от заражения капсульным и бескапсуль-

ными штаммами *H. influenzae* 80-100% мышей. Детоксикация солянокислым гидроксиламином позволила уменьшить токсичность исходного препарата ЛОС (LD50 = 0,063 мкг) в 25 раз (LD50 = 1,58 мкг). Кроме того, получен хроматографически очищенный белоксодержащий препарат (БСП-ВЭ-3), содержащий в своем составе известные протективные белки наружной мембраны *H. influenzae* (P₂; P₃; P₆). Препарат содержал более 60% веществ белковой природы, суммарная примесь нуклеиновых кислот и углеводов не превышала 5%, был хроматографически гомогенен. Препарат обладал низкой токсичностью и в дозе 10 мкг/мышь защищал от гибели 50% мышей после заражения вирулентными культурами. Добавление к белковому препарату 1 мкг/мышь ЛОС усиливало перекрестную протективность обоих препаратов (80-100% мышей выживало). При иммунизации мышей смесью препаратов повышался уровень IgG-антител, как к ЛОС, так и к БСП. При этом, уровень IgG-антител к ЛОС был выше, что указывает на сильную стимуляцию гуморального иммунного ответа ЛОС и делает этот антиген более значимым в составе комплексного препарата для профилактики инфекций, обусловленных капсульными и бескапсульными штаммами гемофильной палочки, чем БСП.

Таким образом, препарат, содержащий 10 мкг БСП-ВЭ-3 и 1 мкг ЛОС, обладал перекрестной протективной активностью, защищая 80-100 мышей от заражения летальными дозами капсульного и бескапсульного штаммов *H. influenzae*. Иммунизация мышей приводила к повышению уровня антител и к ЛОС, и к БСП.