

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

ВИЗУАЛИЗАЦИЯ КЛЕТОК ЧЕЛОВЕЧЕСКОЙ АДЕНОКАРЦИНОМЫ ЯИЧНИКА SKOV-3, ГИПЕРЭКСПРЕССИРУЮЩИХ ОНКОМАРКЕР HER2/NEU, С ПОМОЩЬЮ РЕКОМБИНАНТНОГО БЕЛКА АНТИ-HER2/NEU-МИНИ-АНТИТЕЛО-KILLERRED

Акципетрова Е.О., Эдельвейс Э.Ф., Стрёмовский О.А.,
Чудаков Д.М., Лукьянов К.А., Деев С.М.

*Институт биоорганической химии
им. акад. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН,
Москва, Россия*

В современной онкоиммунологии для диагностики и терапии опухолей широко используются антитела к раковым маркерам. В ~25% случаев рака молочной железы и яичника, а также во многих других видах рака (рак матки, предстательной железы, желудка, легких) на поверхности опухолевых клеток гиперэкспрессирован рецептор HER2/neu. Поскольку наличие этого маркера коррелирует с неблагоприятным прогнозом течения заболевания, его раннее обнаружение имеет большое клиническое значение.

В качестве визуализирующих агентов, конъюгированных с антителами, успешно применяются флуоресцентные белки. Недавно путем скрининга различных флуоресцентных белков на фототоксические свойства и последующего мутагенеза был получен красный флуоресцентный белок KillerRed, являющийся фотосенсибилизатором и цитотоксическим агентом, способным эффективно продуцировать активные формы кислорода при облучении зеленым светом.

Целью данной работы являлось создание рекомбинантного белка на основе anti-HER2/neu-мини-антитела 4D5 к внеклеточному домену рецептора HER2/neu и KillerRed и визуализация с его помощью клеток, гиперэкспрессирующих рецептор HER2/neu.

В ходе работы был создан ген, кодирующий гибридный белок анти-HER2/neu-мини-антитело-KillerRed (4D5-KR). Белок 4D5-KR был наработан в *E. coli* и затем очищен на Ni²⁺-NTA-сефарозе с последующей гель-фильтрацией на Superdex200. Было показано связывание гибридного белка с клетками SKOV-3, гиперэкспрессирующими HER2/neu. Специфичность связывания была подтверждена с помощью конкурентного ингибирования мини-антителом 4D5.

Полученные результаты свидетельствуют о том, что белок 4D5-KR может быть использован для специфической визуализации опухолевых клеток, гиперэкспрессирующих рецептор HER2/neu. Кроме того, свойства KillerRed как фотосенсибилизатора позволяют предполагать наличие у белка 4D5-KR цитотоксических свойств.

В настоящее время ведутся работы по оценке цитотоксического действия белка 4D5-KR на клетки, гиперэкспрессирующие рецептор HER2/neu.

Работа поддержана грантами программы РАН Молекулярная и клеточная биология и РФФИ 07-02-00649 и 06-04-49686.

ИЗМЕНЕНИЕ СОДЕРЖАНИЯ БТШ70 В КЛЕТКАХ ЛИМФОМЫ EL-4 В УСЛОВИЯХ ОКИСЛИТЕЛЬНОГО СТРЕССА

Алекперов Э.А., Шустова О.А., Сапожников А.М.

*Института биоорганической химии
им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова,
Москва, Россия*

Ранее мы обнаружили парадоксальное снижение внутриклеточного содержания белков теплового шока 70 kDa (БТШ70) на начальном этапе реакции клеток костного мозга мыши на стрессирующие агенты, в частности, на ЛПС (бактериальный липополисахарид) и на ФМА (форбол-12-миристинат-13-ацетат), а также в модели воздействия на тимоциты физиологическими медиаторами стресса – катехоламинами. Целью настоящей работы был анализ изменения содержания БТШ70 в лимфоидных клетках линии EL-4 в условиях повреждающего действия окислительного стресса. Клетки подвергали окислительному стрессу, используя экзогенный пероксид водорода в концентрации 100-300 мкМ. Результаты, полученные с помощью проточной цитофлуориметрии, показали, что как и в предыдущих моделях, реакция клеток EL-4 на внесение H₂O₂ характеризовалась первоначальной стадией существенного уменьшения внутриклеточной концентрации БТШ70, последующим этапом ее ожидаемого быстрого роста до величины, значительно превышающей исходный уровень, и заключительной стадией медленного уменьшения цитоплазматического пула БТШ70. Зарегистрированное снижение содержания в клетках этих стресс-индуцируемых протеинов не является артефактом, связанным с агрегацией БТШ70, препятствующей их взаимодействию с проявляющими антителами во время иммунофлуоресцентного окрашивания клеток. Об этом свидетельствуют аналогичные результаты, полученные с помощью анализа клеточного лизата методом Вестерн-блот, обеспечивающим диссоциацию всех белковых комплексов и доступ антител ко всем молекулам БТШ70, содержащимся в образцах. Обнаруженное в наших экспериментах подобие характера изменения внутриклеточного содержания БТШ70 под действием различных по природе

стрессорирующих факторов указывает на универсальность описанной реакции лимфоидных клеток. Мы связываем зарегистрированный феномен временного снижения внутриклеточной концентрации БТШ70 в условиях стресса с выбросом клетками части цитоплазматического пула данных протеинов в окружающую среду. Действительно, БТШ70 являются долгоживущими протеинами, что делает маловероятной возможность их быстрой элиминации в результате гипотетического стресс-индуцированного протеолиза. Такое предположение позволяет рассматривать популяции лимфоидных клеток в качестве одного из источников описанного в литературе появления в сыворотке периферической крови стрессированного организма внеклеточной формы БТШ70.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 06-04-49568).

ТУМОРНЕКРОТИЗИРУЮЩИЙ ФАКТОР КАК УНИВЕРСАЛЬНЫЙ СТИМУЛЯТОР ЭНДОТЕЛИАЛЬНЫХ КЛЕТОК

Амчиславский Е.И., Старикова Э.А., Фрейдлин И.С.

ГУ НИИ экспериментальной медицины РАМН

Ранний воспалительный ответ обычно начинается с продукции и секреции туморнекротизирующего фактора альфа (TNF α) активированными моноцитами крови. Ранее была выявлена способность TNF α повышать экспрессию адгезионных молекул на эндотелиальных клетках (ЭК). С помощью разработанной нами модельной системы с использованием перевиваемой линии ЭК EA.Hy926 было показано, что стимулирующие эффекты TNF α в отношении ЭК значительно шире. Стимулирующее действие TNF α распространяется на экспрессию нескольких поверхностных молекул, на адгезивность ЭК для моноцитов, на активность адгезии самих ЭК к коллагену I типа. Выраженное стимулирующее действие на адгезию ЭК к коллагену I типа оказывал TNF α во всех изученных концентрациях. TNF α в широком диапазоне концентраций от 10 до 1000 ЕД/мл оказывал выраженное индуцирующее действие на экспрессию адгезионных молекул ICAM-1, имеющих низкий спонтанный уровень экспрессии на поверхности клеток линии EA.Hy926. Стимулирующий эффект TNF α был выражен в 5-6 раз сильнее, чем у IFN γ . При низком спонтанном уровне экспрессии молекул VCAM-1 на клетках линии EA.Hy926 TNF α и IFN γ вызывали достоверное повышение уровня экспрессии молекул VCAM-1, причем TNF α оказывал значительно более выраженное действие. При изучении влияния провоспалительных цитокинов на экспрессию интегринального комплекса $\alpha\upsilon\beta 3$ на клетках линии EA.Hy926 стимулирующий эффект был выявлен только у TNF α в концентрации 100 ЕД/мл. Преинкубация эндотелиальных клеток с TNF α вызывала достоверное повышение адгезии моноцитов периферической крови к монослою эндотелиальных клеток линии EA.Hy926. TNF α обладал достоверно более выраженным действием по сравнению с эффектами IFN γ . Преинкубация с TNF α вызывала достоверное повышение адгезивности эндотелиальных клеток для клеток моноцитоподобной линии THP-1. Только TNF α достоверно повышал адгезивность

эндотелиальных клеток и для моноцитов периферической крови, и для клеток моноцитоподобных линий. Сопоставление полученных результатов показало, что изменения экспрессии адгезионных молекул и свойства адгезивности под влиянием TNF α не всегда были однонаправлены. Это свидетельствует о том, что адгезия зависит не только от уровня экспрессии изученных адгезионных молекул на клетках EA.Hy926. Другим важным фактором, определяющим выраженность адгезии ЭК, являются хемокины, изменения уровней секреции которых были нами изучены под влиянием тех же провоспалительных цитокинов. При суточной инкубации ЭК с цитокинами только TNF α оказывал сильное стимулирующее действие на секрецию IL-8 клетками EA.Hy926, вызывая прирост уровня секреции IL-8 в 7 раз по сравнению со спонтанным уровнем. Уровень спонтанной секреции хемокина MCP-1 клетками EA.Hy926 был в 5 раз ниже, чем уровень спонтанной секреции IL-8. Однако TNF α и в этом случае достоверно повышал секрецию хемокина. Для успешной миграции необходим тонко регулируемый баланс между адгезией и протеолитическими процессами. Главную роль в этом играют металлопротеиназы матрикса (MMPs). TNF α оказывал стимулирующее действие на продукцию MMP-9 клетками EA.Hy926, причем, эффект TNF α имел дозозависимый характер и был более выраженным, чем эффекты других провоспалительных цитокинов. Приведенные результаты свидетельствуют о том, что стимулирующее действие TNF α распространяется и на секреторную активность ЭК.

Исследование поддержано грантом РФФИ № 06-04-48110.

ВЛИЯНИЕ ИММУНИЗАЦИЕЙ ЭРИТРОЦИТАМИ БАРАНА (ЭБ) НА НЕРВНУЮ И ИММУННУЮ СИСТЕМЫ МЫШЕЙ С РАЗЛИЧНЫМ ИСХОДНЫМ УРОВНЕМ ОРИЕНТИРОВОЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКОГО ПОВЕДЕНИЯ

Артамонов С.А., Колесников О.Л., Борисова Л.С.

НИИ иммунологии ГОУ ВПО «Челябинской государственной медицинской академии Федерального агентства по здравоохранению и социальному развитию», кафедра медицинской биологии и генетики ЧелГМА, г. Челябинск

Накопленные за последнее время данные о тесной взаимосвязи иммунной и нервной систем говорят, что необходимо изучать механизмы и закономерности взаимного влияния этих систем. Также хорошо известен факт, что люди отличаются друг от друга по типам ВНД, у животных аналогичное разделение на группы возможно с помощью определения уровня ориентировочно-исследовательского поведения [Абрамов В.В., 2004] (ОИП). Поэтому мы решили оценить влияние иммунизации ЭБ на состояние иммунной и нервной систем у мышей с различным исходным уровнем ОИП при повторных исследованиях в открытом поле.

Работа выполнена на мышах весом 20-25 г. У животных исследовалось поведение в тесте «Открытое поле». С помощью кластерного анализа животные разделялись на 3 группы с разным уровнем ОИП. Мыши повторно тестировались и далее иммунизировались ЭБ. Разреша-

ТАБЛИЦА. СОСТОЯНИЕ ИММУННОЙ И НЕРВНОЙ СИСТЕМ (к работе Артамонова С.А. и соавт.)

| | Мыши со средним ОИП (n = 14) | Мыши с низким ОИП (n = 14) | |
|----------------------------------|-------------------------------------|-------------------------------|--------------|
| 1 | 2 | 3 | |
| | M±σ | M±σ | P (2-3) |
| Для определения уровня ОИП (А) | | | |
| Горизонтальная активность | 85,70±9,52 | 44,77±16,02 | P = 0,001(U) |
| Стойка с упором | 15,43±6,37 | 7,42±6,41 | P = 0,001(U) |
| Выглядывание | 10,16±8,67 | 5,19±6,55 | P = 0,007(U) |
| Перед иммунизацией (Б) | | | |
| Горизонтальная активность | 70,32±33,66 P = 0,008 (VK) (А-Б) | 45,19±22,45 | P = 0,014(U) |
| Стойка с упором | 17,78±15,95 | 9,42±6,93 | P = 0,016(U) |
| Выглядывание | 13,22±13,81 | 5,77±6,84 | P = 0,008(U) |
| Перед забоем (В) | | | |
| Горизонтальная активность | 45,07±26,55 | 43,55±30,66 | Н.д |
| Стойка с упором | 12,07±10,34 | 11,64±17,32 | Н.д |
| Выглядывание | 9,86±9,94 | 9,14±14,13 | Н.д |
| ЯСК тимуса/масса тимуса (млн/мг) | 1,59±0,50 | 1,40±0,57 | P = 0,014(U) |
| Моноциты, % | 1,43±1,16 | 1,32±1,49 | P = 0,014(U) |
| Активн. НСТсп, % | 29,57±4,96 | 33,64±5,89 | P = 0,042(U) |
| Интенсив. НСТсп (клеток/100) | 0,32±0,06 | 0,37±0,08 | P = 0,043(U) |
| Интенсив. НСТинд (клеток/100) | 0,42±0,03 | 0,46±0,14 | P = 0,035(U) |

ющая доза ЭБ вводилась под апоневроз задней лапы через 72 ч после иммунизации. Реакция оценивалась через 24 ч по коэффициенту интенсивности. Измерялась масса селезенки и тимуса и подсчитывалось количество ядро-содержащих клеток в этих органах, определялась лейкоцитарная формула периферической крови, оценивался фагоцитоз нейтрофилов периферической крови и НСТ-тест нейтрофилов. Полученные результаты обработаны с использованием STATISTICA 6.0. При определении достоверности различий между группами использовались непараметрические критерии Манна-Уитни (U). Для связанных переменных применяли парный критерий Вилкоксона (VK). Полученные результаты приведены в таблице.

Из таблицы видно, что повторное исследование поведения приводит к снижению горизонтальной активности мышей в группе со средним ОИП. Дальнейшая иммунизация нивелирует различия между параметрами поведения в исследуемых группах, но в параметрах иммунной системы были существенные отличия.

Вывод: иммунизация ЭБ по-разному влияет на нервную и иммунную систему животных с разным исходным уровнем ОИП.

ИММУНОМОДУЛЯТОРЫ МИКРОБНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ КАК СТИМУЛЯТОРЫ ВРОЖДЕННОГО ИММУНИТЕТА

Ахматова Н.К.

ГУ НИИ вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова
РАМН, Москва, Россия

В настоящее время одним из перспективных направлений считается применение иммуномодуляторов мик-

робного происхождения, активирующих иммунные реакции против опухолей и инфекций. Механизмом действия данных препаратов, несущих патоген-ассоциированные молекулярные структуры (ПАМС), является активация системы эффекторов врожденного иммунитета, к которым относят дендритные клетки (ДК), натуральные киллеры (NK) и др.

Иммуномодулирующими свойствами обладают поликомпонентная бактериальная вакцина Иммуновак-ВП-4 и липоид. Иммуновак-ВП-4 состоит из антигенов условно-патогенных микроорганизмов, содержащих ПАМС: ЛПС, пептидогликаны, липопротеины, липид А, тейхоевые кислоты. Действующим началом липоида является ГМДП (N-ацетилглюкозамин-N-ацетилмурамоил-дипептид), содержащий в качестве ПАМС пептидогликан и муреин.

Цель исследования: изучение изменения иммунофенотипа ДК и функциональной активности эффекторов врожденного иммунитета под воздействием Иммуновак-ВП-4 и ГМДП.

Цитотоксический потенциал МЛ доноров (n = 15) определяли на линии клеток эритробластного лейкоза K562 при помощи МТТ-теста. Пролиферативную активность МЛ мышей линии СВА (n = 15) оценивали колориметрическим тестом с использованием витального красителя Alamar Blue (US). ДК получали из клеток костного мозга мышей при инкубации с рекомбинантными GM-CSF и IL-4 (Biosource, США). В качестве индукторов созревания ДК использовали Иммуновак-ВП-4 (25 мкг/мл) и ГМДП (10 мкг/мл). Фенотип ДК оценивали с помощью моноклональных антител (Caltag Laboratories, США) против соответствующих антигенов. Пролиферативная активность МЛ, выделенных из селезенки мышей через 24 ч после иммунизации Иммуновак-ВП-4 (200 мкг), увеличивалась с 3,0±0,3% до 14,5±1,3%, после иммунизации ГМДП (100 мкг) – до 13,4±1,0% (p < 0,05).

Цитотоксическая активность НК здоровых доноров по отношению к НК-чувствительной линии клеток эритробластного лейкоза *in vitro* под воздействием Иммуновак-ВП-4 усиливалась в 2,5 раза, а ГМДП в 2,3 раза. Под воздействием данных иммуномодуляторов усиливалась экспрессия костимулирующих молекул CD40, CD80, CD86, молекул антигенного представления МНС I и МНС II на поверхности дендритных клеток (ДК), генерированных из клеток костного мозга мышей, что свидетельствует об их созревании. При этом отмечалась незначительная экспрессия макрофагального маркера F4/80, который, возможно, появляется в ответ на стимуляцию ЛПС, входящим в состав поликомпонентной вакцины. ДК обладали способностью усиливать бласттрансформацию сингенных лимфоцитов мышей и повышать цитотоксичность МЛ по отношению к клеткам YAC-1 и опухоли Эрлиха. Полученные данные свидетельствуют о возможности применения Иммуновак-ВП-4 и ГМДП для активации эффекторов врожденного иммунитета и использования в качестве индуктора созревания ДК при получении ДК-вакцин.

ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ АКТИВНОСТЬ ПЕРИТОНЕАЛЬНЫХ ФАГОЦИТОВ И ЭНТЕРОТОКСИГЕННЫЕ БАКТЕРИИ РОДА *ENTEROBACTER*

Ахтариева А.А.¹, Габидуллин З.Г.¹, Биалов Ф.С.¹, Аскарлова Д.Н.¹, Корюкова Т.С.², Камалова А.А.²

¹ ГОУ ВПО «Башкирский государственный медицинский университет» Росздрава, г. Уфа, Россия

² Республиканская клиническая больница им. Г.Г. Куватова, г. Уфа, Россия

Фагоцитарное звено иммунитета является одним из ключевых факторов неспецифической защиты организма. Бактериальные клетки, которые обладают способностью проникать через естественные барьеры, в первую очередь, встречаются с фагоцитирующими клетками организма хозяина. При этом возбудители болезней экспрессируют целый ряд факторов патогенности, среди которых значимым является термолabileный энтеротоксин (ЛТ-энтеротоксин). В этой связи возникло предположение, что функциональный ответ этих клеток неодинаков. Данное предположение и определило цель исследования.

Цель: оценить функциональную активность перитонеальных макрофагов мышей после активации энтеротоксинпродуцирующим штаммом *Enterobacter*.

Материалом для изучения послужил клинический штамм *Enterobacter cloacae* № 258, депонированный нами в ГИСК им. Л.А. Тарасевича, обладающий комплексом факторов патогенности, среди которых ведущим является продукция ЛТ-энтеротоксин. Клинический штамм *E. cloacae* был изолирован от больных с инфекцией желудочно-кишечного тракта.

Для выявления дифференциального действия ЛТ-энтеротоксина на клетки хозяина опыты проводились в комбинациях: *E. cloacae*, продуцирующий ЛТ-энтеротоксин, его изогенная пара — культура *E. cloacae*, не продуцирующая ЛТ-энтеротоксин, супернатант бульонной культуры *E. cloacae*, содержащей ЛТ-энтеротоксин, и контрольная группа (физиологический раствор).

Исследование фагоцитарной активности перитонеальных нейтрофилов проводили на модели поглощения частиц полистирольного латекса. Функциональный ответ нейтрофилов оценивали по лизосомальной активности. Изучение внутриклеточного кислород зависимого метаболизма фагоцитов проводили с использованием метода с нитросиним тетразолием — НСТ-тест. Статистическую обработку проводили согласно критерию Стьюдента и программы STATISTICA for Windows 5.0.

Установлено, что исследование активности фагоцитоза между группами обследуемых не имела явных достоверных различий. Активность фагоцитоза в группе, зараженной энтеротоксин продуцирующим штаммом *E. cloacae*, была низкой и составила $79,62 \pm 1,06\%$. В группе изогенной пары *E. cloacae* активность фагоцитоза была ниже и составила, соответственно, $74,13 \pm 1,13\%$ и $73,62 \pm 1,51\%$. В группе мышей, зараженных супернатантом, содержащим ЛТ-энтеротоксин *E. cloacae*, наблюдали постепенное снижение активности фагоцитоза ($83,37 \pm 1,30$ и $75,12 \pm 0,83$ соответственно). В контрольной группе активность фагоцитоза варьировала: была высокой на 1 день и низкой на 3 ($94,50 \pm 1,51$ и $63,3725 \pm 0,19$ соответственно).

Поглотительная способность одним фагоцитом частиц латекса во всех группах была одинакова в 1 день исследования. На 3 день интенсивность фагоцитоза достоверно снижалась как в опытной, так и в контрольной группе. Однако значимо выше фагоцитировались в группе, зараженной ЛТ-энтеротоксинпродуцирующим штаммом *E. cloacae* и супернатантом бульонной культурой *E. cloacae*. В группе с изогенной парой *E. cloacae* и контрольной группе наблюдали средние значения интенсивности фагоцитоза.

Активация лизосомальных гранул в перитонеальных фагоцитах наблюдалась уже в 1 день после инфицирования, как в опытной, так и контрольной группе. На 3 день опытов наблюдали резкое снижение лизосомальной активности фагоцитов в группе, зараженной энтеротоксин продуцирующим штаммом *E. cloacae*. В группе мышей, зараженных изогенной парой *E. cloacae* и ЛТ-энтеротоксином, насыщенность и активность фагоцитов сохранялась на 3 день исследования. На 5 и 14 дни опытов в перитонеальных фагоцитах лизосомальная активность понижалась до минимума, как в контрольной, так и в опытной группе мышей, что характеризовалась полной дегрануляцией лизосомальных ферментов.

У контрольной группы животных уровень спонтанной и индуцированной активации фагоцитов к восстановлению нитросинего тетразолия составил, соответственно, $0,33 \pm 0,013$ и $0,63 \pm 0,14$ усл.ед. Внутрибрюшинное ведение мышам ЛТ-энтеротоксина увеличивало генерацию метаболитов при адгезии перитонеальных фагоцитов на 1 день ($0,76 \pm 0,012$ усл.ед.), но уже на 3 сутки происходило понижение этого показателя до уровня контрольных значений ($0,28 \pm 0,07$ усл.ед.). Индуцированный ответ перитонеальных клеток также резко усиливался по сравнению с контролем через 1 сутки и снижался на 3 сутки.

В группе животных, зараженных энтеротоксигенной культурой *E. cloacae*, наблюдалась спонтанная активация фагоцитов восстанавливать нитросиний тетразолий на 1 день опытов ($0,86 \pm 0,08$ усл.ед.). Через 3 дня происходило некоторое снижение индуцированного фагоцитоза ($0,55 \pm 0,92$ усл.ед.). Тенденция к снижению кислородного метаболизма сохранялась на 15 день, особенно, при ин-

дуцированном ответе. Индукция фагоцитов изогенной культурой *E. cloacae* приводит к активации процессов образования активных форм кислорода на 1 день исследования и долгое время остается относительно постоянной.

Искусственная активация способности фагоцитов к восстановлению нитросинего тетразолия в диформазан, в опытах индуцированного НСТ-теста с латексом, отражает резервные возможности клеток к образованию активных форм кислорода, вскрывая потенциальную способность ответить респираторным взрывом на раздражители. Исследование в динамике индукции фагоцитов латексом в целом свидетельствовало об активации процессов образования активных форм кислорода и, особенно в клетках животных с нетоксигенной культурой *E. cloacae*. Данные свидетельствуют о предельных возможностях работы гексозомонофосфатного шунта клеток под действием токсина, которые характеризовались недостаточностью антиоксидантной системы фагоцитов, поскольку показатели количества образования свободных радикалов без индукции были намного выше.

Таким образом, исследование функции перитонеальных макрофагов свидетельствует о том, что индукция макрофагов ЛТ-энтеротоксинпродуцирующим штаммом *E. cloacae* существенно стимулирует кислородзависимый метаболизм, и, видимо, в их деградации играют важную роль гидролитические ферменты, заключенные в лизосомах перитонеальных макрофагов. При этом ЛТ-энтеротоксин *E. cloacae* подавляет интенсивность фагоцитоза, проницаемость лизосомальных мембран и нарушает функцию ферментов гексозомонофосфатного шунта.

ОСОБЕННОСТИ РЕПАРАТИВНОГО ОСТЕОГЕНЕЗА ПРИ СТИМУЛЯЦИИ ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ ФАГОЦИТОВ

Базарный В.В., Щеколдин П.И., Исайкин А.И., Крохина Н.Б., Тихонина Е.А.

ГОУ ВПО «Уральская государственная медицинская академия» Росздрава

ГУЗ СО «Институт медицинских клеточных технологий», г. Екатеринбург, Россия

Участие иммунной системы в регуляции физиологической и репаративной регенерации хорошо известно, однако возможности направленной иммуномодуляции восстановительных процессов по-прежнему дискутируются. Этим определена цель данной работы — изучить особенности течения репаративного остеогенеза при стимуляции фагоцитирующих клеток.

Материал и методы. Исследование проведено на 42 беспородных крысах. Индукцию регенерации кости осуществляли путем резекции фрагмента большеберцовой кости. В динамике восстановительного процесса определяли клеточный состав крови и костного мозга, активность щелочной фосфатазы. Для оценки фагоцитарной активности использовали комплекс тестов: количество нейтрофилов и моноцитов-макрофагов в костном мозге и крови, функционально-метаболическая активность нейтрофилов (цитохимические реакции на миелопероксидазу и лизосомальные катионные белки, НСТ-тест), поглотительная активность макрофагов

(по клиренсу туши *in vivo*). На 10 сутки, при наивысшей выраженности восстановительных процессов, у части животных проводили гистологическое исследование формирующегося регенерата.

В качестве неспецифического модулятора функционального состояния фагоцитирующих клеток использовали магнитолазерное воздействие (МЛВ), которое вызывает в организме комплекс реакций, в том числе — активацию фагоцитоза. Для специфической стимуляции продукции фагоцитов и их активности животным вводили гранулоцитарный колониестимулирующий фактор (Г-КСФ). Обработка результатов проведена с использованием программы Biostat.

Результаты и их обсуждение. В динамике репаративного остеогенеза установлена фазная реакция фагоцитов: в раннем послеоперационном периоде отмечается умеренный нейтрофильный лейкоцитоз, сопровождающийся некоторым угнетением функциональной активности нейтрофилов. К 10 суткам — в период наивысшей активности репаративных процессов, показатели состояния системы нейтрофильных гранулоцитов восстанавливаются до нормальных значений, увеличивается содержание моноцитов в крови и в костном мозге, повышается поглотительная способность макрофагов. К 20 суткам посттравматического периода, когда достигнута полная консолидация костной ткани, все изученные параметры возвращаются к исходным значениям.

Под влияние МЛВ посттравматическая нейтрофильная реакция несколько более выражена, чем у контрольных животных, в том числе и активированы метаболические процессы в нейтрофилах, повышалось число фагоцитирующих клеток в костном мозге, поглотительная активность макрофагов. У части животных к 10 суткам наблюдалась полная репарация костной ткани между отломками (чего не отмечалось в контрольной группе), выраженная пролиферация остеобластов и уменьшение числа остеокластов, снижение интенсивности воспалительной реакции.

При введении животным Г-КСФ отмечена выраженная стимуляция нейтрофильного роста кроветворения с повышением индекса митотической активности клеток данного ряда до 2,4% (в контроле — 0,8%). При этом функциональная активность нейтрофилов периферической крови не отличалась от показателей контрольных животных. Содержание моноцитов в крови и костном мозге не изменялось. Под влиянием данного ростового фактора выраженность воспалительной реакции оставалась достаточно заметной, в воспалительном инфильтрате — большое количество нейтрофилов и макрофагов. Пролiferация остеобластов умеренно выражена.

Таким образом, активный репаративный остеогенез характеризуется умеренной стимуляцией системы моноцитарно-макрофагальных клеток. Применение в посттравматическом периоде МЛВ приводит к стимуляции костеобразования. Данный эффект реализуется через ряд известных механизмов (противовоспалительный, иммуномодулирующий, нормализация микроциркуляции и метаболизма), а также путем установленной нами активации остеобластических процессов. Возможно, это происходит вследствие повышенной продукции ростовых факторов (монокинов и нейтрофилокинов).

Введение Г-КСФ стимулирует гранулоцитопоз и функциональную активность нейтрофилов, что под-

держивает активность воспалительного процесса в пост-травматическом периоде, а также стимуляцию остеокластических процессов. Это оказывает на остеогенез ингибирующее действие.

СРАВНИТЕЛЬНЫЕ МОРФО-ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ АСПЕКТЫ ИЗУЧЕНИЯ ВИРУСНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ И АЛЛЕРГИЧЕСКИХ СОСТОЯНИЙ

Бархина Т.Г.¹, **Никитина Г.М.**¹, **Польнер С.А.**², **Кондратьев В.Е.**¹

¹ *ГУ НИИ морфологии человека РАМН*

² *ГНЦ Институт иммунологии ФМБА России, Москва, Россия*

Изучение ряда вирусных инфекций и аллергических заболеваний дает основание считать, что клеточные, субклеточные и молекулярные механизмы, лежащие в основе этих состояний, имеют как сходные, так и альтернативные черты. Следует отметить, что изучение этих механизмов с помощью морфологических методов исследования находится на первоначальном этапе и имеет только фрагментарные наметки.

Целью настоящего исследования явился сравнительный анализ морфологических изменений на клеточном и субклеточном уровнях некоторых вирусных инфекций (грипп, парагрипп, папилломавирусная инфекция (ПВИ), ВИЧ-инфекция) и аллергических болезней (аллергический ринит, бронхиальная астма) у человека и при воспроизведении их на моделях у экспериментальных животных. Исследованы клетки различных органов дыхательной и пищеварительной систем и периферической крови. Методы исследования: световая микроскопия (СМ), электронная микроскопия – сканирующая (СЭМ) и трансмиссионная (ТЭМ).

При изучении препаратов с помощью СМ выявить какие-то характерные общие черты между исследуемыми сравниваемыми структурными объектами нам представилось затруднительным. При электронномикроскопическом анализе такие черты нами были обнаружены. Во-первых, при исследовании клеток периферической крови с помощью СЭМ и ТЭМ обнаружилось изменение форм, конфигураций эритроцитов, лейкоцитов и тромбоцитов, а также деструктивные изменения органелл лимфоцитов и тромбоцитов. При изучении этих клеток в случаях с вирусными заболеваниями установлено наличие вирусных частиц и включений не только в этих популяциях клеток, но и в альвеолярных макрофагах и в эпителиоцитах бронхиального дерева, тонкой и толстой кишки.

Деструктивные изменения органелл при вирусных инфекциях имеют свои особенности: в основном эти изменения касаются гранулярного эндоплазматического ретикулума, элементов комплекса Гольджи и парануклеарной области. При аллергических состояниях в большей степени повреждаются митохондрии, плазматические мембраны и ядра клеток.

При ВИЧ-инфекции в дополнение к уже описанным изменениям присоединяются вновь образующиеся мембранно-гранулярные структуры, включающие в себя дегранулированные цистерны ретикулума и измененные

фрагменты органелл клеток, что является характерным только для этой инфекции.

Таким образом, нами установлено, что при вирусных инфекциях и аллергических состояниях обнаруживаются как сходные, так и отличительные субмикроскопические изменения в различных популяциях клеток. Все они свидетельствуют о различных нарушениях метаболического и деструктивного характера.

ПОЧЕМУ МУТАЦИЯ В-КЛЕТОЧНОЙ ТИРОЗИНКИНАЗЫ ВТК ОТМЕНЯЕТ Т-ЗАВИСИМЫЙ ЭФФЕКТ ВАКЦИНЫ ВСГ: ИССЛЕДОВАНИЕ МЕХАНИЗМОВ

Батурина И.А., Рубакова Э.И., Апт А.С., Кондратьева Т.К.

ЦНИИ туберкулеза РАМН, Москва

Вакцина ВСГ до сих пор остается единственной широко используемой противотуберкулезной вакциной. При этом вакцинация ВСГ далеко не всегда эффективно защищает от заболевания туберкулезом. Эффективность вакцинации детей в разных популяциях человека варьирует от 80% до полного отсутствия эффекта [Bloom, Fine, 1994]. Одной из важных возможных причин высокой вариабельности ответа на вакцинацию ВСГ могут быть генетически детерминированные различия в иммунном ответе на вакцинацию в разных популяциях, но этот вопрос никогда подробно не изучался. Более того, до недавнего времени не было описано надежных экспериментальных моделей генетических вариаций иммунного ответа на вакцину ВСГ. В середине 90-х годов в нашей лаборатории было показано, что мутантные мыши линии СВА/Н не способны формировать протективный иммунитет в ответ на вакцинацию ВСГ [Nikonenko V. et al., 1996]. Мыши СВА/Н отличаются от мышей исходной линии (СВА) рецессивной мутацией в X-хромосоме, которая была картирована и получила название *xid* (X-linked immune deficiency) [Berning et al., 1980]. Позднее был идентифицирован ген, в котором произошла точковая нонсенс-мутация *xid*. Оказалось, что этот ген кодирует тирозинкиназу Брутона (Btk) из семейства Тес-киназ.

Задачей нашего исследования было изучение причин того, почему у мышей с дефектом В-клеточного звена иммунитета не формируется протективный иммунный ответ против туберкулезной инфекции, который, как считается, зависит исключительно от Т-клеток и макрофагов. В частности, с помощью сравнительного анализа параметров иммунного ответа у мышей СВА/Н, мы попытались определить, какое звено в цепи иммунологических реакций выпадает при вакцинации мышей СВА/Н. Оказалось, что выявленные отличия очевидны: у мышей СВА/Н меньше В-клеток, соответственно, снижена экспрессия CD40; у них уменьшено количество В-1а клеток в плевральной и перитонеальной полости; у них снижена продукция антител класса IgM. Остальные отличия между линиями мышей СВА/Н и СВА были несущественны. Единственным существенным фактом оказалось то, что у мышей СВА/Н, вакцинированных ВСГ и зараженных *M. tuberculosis* H37Rv, в 4-5 раз снижено количество CD4⁺Т-клеток, продуцирующих IFN γ , по сравнению с мышами СВА. Полученный результат пред-

ставляется особенно важным, так как известно, что IFN γ – это основной цитокин, активирующий макрофаги для внутриклеточного киллинга микобактерий. Однако все эти данные не дают ответа на вопрос о связи экспрессии Vtk в В-клетках с формированием длительной Т-клеточной памяти. Первоначально считалось, что киназа Vtk экспрессируется исключительно в В-клетках. Однако впоследствии оказалось, что Vtk экспрессируется почти во всех клетках гемопоэтического ростка кроме плазматических и Т-клеток. По данным литературы, макрофаги мышей СВА/Н отличаются от макрофагов мышей СВА по продукции некоторых цитокинов, по уровню фагоцитоза, а также обладают повышенной склонностью к апоптозу. Таким образом, вполне возможно участие Vtk в функционировании макрофагов при туберкулезной инфекции, а это – прямая возможность влиять на характер иммунного ответа к микобактериям. В частности, не мешая нормальной презентации растворимых антигенов, мутация может влиять на процессинг живых микобактерий BCG макрофагами. Для выяснения этого вопроса мы исследовали возможность вакцинации мышей СВА/Н соникатом микобактерий. Оказалось, что при такой иммунизации уровень протекции у мышей СВА и СВА/Н при туберкулезной инфекции оказался одинаковым. По-видимому, причиной выявленных отличий при вакцинации живой BCG и соникатом микобактерий может быть дефект процессинга и презентации антигенов Т-клеткам макрофагами мышей СВА/Н, что приводит к нарушению формирования Т-клеток памяти. Для дальнейшего изучения этого предположения мы исследовали антигенпрезентирующую функцию макрофагов *in vitro*. Для этого мы вводили мышам внутрибрюшинно BCG и исследовали способность перитонеальных макрофагов индуцировать пролиферативный ответ антигенспецифических Т-клеточных линий *in vitro*. Показано, что макрофаги мышей СВА вызывают высокий пролиферативный ответ Т-клеток, полученных как от мышей СВА, так и от мышей СВА/Н. Напротив, макрофаги СВА/Н не поддерживали пролиферацию Т-клеток обеих линий. Учитывая раннюю гибель макрофагов мышей СВА/Н после контакта с BCG, предполагается исследовать роль апоптоза в этом процессе.

СНИЖЕНИЕ АКТИВНОСТИ С3-КОМПОНЕНТА КОМПЛЕМЕНТА ПОД ДЕЙСТВИЕМ IgM-ФРАКЦИИ ИЗ ПЭГ-ПРЕЦИПИТАТОВ СЫВОРОТКИ КРОВИ ЗДОРОВЫХ ЛЮДЕЙ

Бельтюков П.П., Владимирова Л.Г., Пеньков К.Д., Корно Н.В.

Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И.П. Павлова

Считается, что циркулирующие иммунные комплексы (ЦИК) приводят к снижению активности комплемента посредством ковалентного связывания с С3b или с С3bi через IgG в составе комплекса. Одним из последствий этого взаимодействия является солубилизация ЦИК. Любые ЦИК, как IgG-, так и IgM-содержащие, а также некоторые глобулины сыворотки крови могут осаждаться в присут-

ствии полиэтиленгликоля (ПЭГ) с молекулярной массой 6000 Da в различных концентрациях. Не вполне ясно, как отражается на эффективности взаимодействия С3 и ЦИК присутствие в таких комплексах иммуноглобулинов разных классов или свободных иммуноглобулинов в растворе.

Для оценки процессов связывания С3 с ЦИК использовали ПЭГ-преципитаты, полученные из смешанных сывороток крови практически здоровых лиц путем осаждения 2,5% ПЭГ-6000 в 0,3 М Трис-НСl буфере (рН 7,4) и очищенные от примесей ПЭГ с помощью гель-фильтрации на колонке (0,8 x 16 см), заполненной Сефадексом G-15 уравновешенной 0,9% раствором NaCl. В полученных фракциях определяли содержание белка, оценивали размеры частиц методом лазерной корреляционной спектроскопии (ЛКС), а также определяли содержание IgG и IgM иммунотурбидиметрическим методом.

Содержание белка во фракциях, полученных после гель-фильтрации ПЭГ-преципитатов, не превышало 150 мкг/мл. Методом ЛКС обнаружено, что частицы размером более 151 нм (что соответствует размеру крупных иммунных комплексов) в исследованных фракциях либо отсутствуют полностью, либо присутствуют в количествах, не превышающих 9-12% от общего количества частиц в растворе. Обращает на себя внимание тот факт, что количество крупных частиц существенно увеличивается при повышении концентрации белка в исследуемом образце, что указывает на возможность образования спонтанных агрегатов, которые выявляются методом ЛКС.

Для повышения чувствительности при исследовании влияния ЦИК на С3 использовали метод регистрации гемолитической активности в условиях лимитирующих концентраций С3 в присутствии реагента RC3. С помощью такого метода анализа можно зарегистрировать даже незначительные изменения активности С3. Разведенную в 6 раз сыворотку крови, используемую в качестве источника С3 (10-20 мкл), подвергли преинкубации с препаратами ЦИК в течение 2 минут при комнатной температуре в отсутствие клеток-мишеней. Препараты ЦИК, полученные путем осаждения 2,5% ПЭГ и дополнительно очищенные гель-фильтрацией, которые содержали значительное количество (> 10%) белковых комплексов средних размеров (около 100 нм) обладали наибольшим ингибирующим действием, обусловленным связыванием С3b. Это ингибирование оказалось дозозависимым по отношению к концентрации иммунных комплексов средних размеров в растворе, но никогда не приводило к полному угнетению (максимальное угнетение составило 70-80% по сравнению с контролем). При иммунотурбидиметрическом анализе иммуноглобулинов в этих фракциях оказалось, что они содержат главным образом IgM (в среднем 30-50 мкг/мл) и почти не содержат IgG (менее 5 мкг/мл). Угнетающее действие препарата ЦИК на С3 до гель-фильтрации было менее эффективным, чем угнетение IgM-содержащей фракцией после гель-фильтрации.

Таким образом, в препаратах ЦИК из крови здоровых лиц наибольший вклад в активацию С3 и связывание образующегося насцентного С3b вносят иммунные комплексы средних размеров, образованные с участием IgM и/или отдельные молекулы IgM, находящиеся вне иммунных комплексов. Эффективность связывания С3b находится в прямой зависимости от концентрации содержащихся в растворе иммунных комплексов.

ВЛИЯНИЕ ФЕРМЕНТАТИВНОГО ДЕФОСФОРИЛИРОВАНИЯ ЛПС ЧУМНОГО МИКРОБА НА ФУНКЦИОНАЛЬНУЮ АКТИВНОСТЬ МАКРОФАГОВ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ ЖИВОТНЫХ

Беспалова И.А., Васильева Г.И., Гончарова Л.А., Иванова И.А., Киселёва А.К., Дорошенко Е.П.

ФГУЗ научно-исследовательский противочумный институт, г. Ростов-на-Дону, Россия

Известно, что токсичность ЛПС определяется наличием в составе его липида А глюкозаминового дисахарида, несущего две фосфатные группировки, 5–6 остатков жирных кислот (ацилов) и имеющего хотя бы одну ацилоксиацильную связь [Книрель Ю.А., Кочетков Н.К., 1993; Brade H. et al., 1988]. В связи с этим уменьшения или отмены токсичности ЛПС можно достигнуть как путем дезацилирования [Munford R.S. et al., 1988], так и дефосфорилирования его молекул [Kotani S. et al., 1986]. При изучении свойств детоксицированных разными способами ЛПС энтеробактерий установлено, что снижение токсичности ЛПС возможно без угнетения иммуностимулирующей активности этого важного компонента наружной мембраны грамотрицательных бактерий [Brade H. et al., 1988; Chedid L. et al., 1975; Munford R.S. et al., 1986]. В последние годы показана возможность получения модифицированных форм ЛПС чумного микроба со сниженной токсичностью [Гусева Н.П. и др., 1991; Ермакова Г.В. и др., 1992; Федорова В.А. и др., 1993]. Однако до настоящего времени мало информации о влиянии ферментативной детоксикации ЛПС чумного микроба на его иммунобиологические свойства. Ранее нами показано, что ферментативное дефосфорилирование ЛПС чумного микроба ведет к ослаблению токсичности модифицированного препарата в условиях *in vivo* и *in vitro* [Беспалова И.А. и др., 2006]. Учитывая, что чумной микроб является внутриклеточным паразитом и что именно в макрофагах решается судьба его взаимодействия с макроорганизмом как при инфекционном, так и при вакцинном процессах [Наумов А.В. и др., 1992], представляет интерес оценка влияния препаратов ЛПС на функциональную активность макрофагов.

Цель настоящего исследования: сравнительное изучение действия исходного и ферментативно дефосфорилированного ЛПС чумного микроба на фагоцитарную активность макрофагов (Мф) перитонеального экссудата экспериментальных животных.

Препараты ЛПС из бактерий *Yersinia pestis EV* получали по модифицированному нами методу Westphal O. (1956), химически дефосфорилированный ЛПС — обработкой исходного ЛПС плавиковой кислотой [Беспалова И.А. и др., 1995]. Для получения ферментативно дефосфорилированного ЛПС (ДФ-ЛПС) к 1% раствору исходного препарата добавляли коммерческую щелочную фосфатазу из тонкого кишечника теленка [Serva, Германия] в концентрации $1 \times 10^{-4}\%$. Гидролиз продолжали в течение 1–2 ч при 37°C. Для удаления фермента осуществляли фенольную депротеинизацию гидролизата при 68°C. Полученную смесь центрифугировали и после диализа супернатанта против дистиллированной воды лиофильно высушивали. Перитонеальные Мф выделяли по методу Кротковой М.И. (1971). Действие препаратов на фагоцитарную активность изучали в системе: «Мф + *Y. pestis EV* (1:25) + исследуемый

препарат» по описанной ранее методике [Васильева Г.И. и др., 1983]. При изучении фагоцитарной активности Мф определяли процент активных фагоцитов (ПАФ) — отношение числа фагоцитов с захваченными микробами к числу подсчитанных клеток, выраженное в процентах; фагоцитарный индекс (ФИ) — отношение количества микробов, захваченных сосчитанными фагоцитами, к их числу; и индекс завершенности фагоцитоза (ИЗФ), определяемый по формуле: $ИЗФ = (ФИ_1 - ФИ_4) / ФИ_1$, где $ФИ_1$ — фагоцитарный индекс через 1 ч, а $ФИ_4$ — фагоцитарный индекс через 4 ч.

Проведенные исследования показали, что препараты ДФ-ЛПС чумного микроба, в отличие от исходного и химически дефосфорилированных ЛПС, характеризуются пониженными летальной токсичностью (около 2 мг против 0,5 и 1,6 мг соответственно) и цитотоксическим эффектом в отношении Мф мышей и морских свинок, особенно в минимальной испытанной дозе — 0,1 мкг/мл экссудата. ДФ-ЛПС существенно снижает цитопатический эффект *Y. pestis EV* и повышают киллерную активность Мф животных за счет увеличения их переваривающей способности и сдвига ИЗФ в положительную сторону.

Таким образом, ферментативное дефосфорилирование ЛПС *Y. pestis EV* приводит не только к снижению его токсичности, но и к усилению его иммуностимулирующих свойств.

СРАВНИТЕЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ ИММУНОМОДУЛИРУЮЩЕЙ АКТИВНОСТИ И МЕХАНИЗМОВ МЕТАБОТРОПНОГО ДЕЙСТВИЯ ПОЛИОКСИДОНИЯ, ТРЕКРЕЗАНА И БЕМИТИЛА

Болахан А.В., Антоненкова Е.В., Цыган В.Н., Зарубина И.В., Бубнов В.А.

Военно-медицинская академия, Санкт-Петербург, Россия

Введение. Современная патология инфекционных заболеваний характеризуется существованием порочного патогенетического круга между заболеваемостью и распространенностью вторичных иммунодефицитов. Особенно наглядно данное положение проявляется при анализе частоты бронхолегочных заболеваний. Как следствие — настоятельная необходимость совершенствования традиционных и разработка новых схем терапии. В этом плане актуальным является применение на фоне этиотропной терапии средств, способствующих целенаправленной реабилитации иммунитета и коррекции метаболических нарушений гипоксического генеза. Привлекательно применение средств, обладающих как иммуномодулирующей, так и метаботропной активностью. К настоящему времени в доступном арсенале имеются фармагенты, которые отвечают сформулированному требованию. К их числу относятся синтетические средства разных групп: актопротектор бемитил и иммуномодуляторы полиоксидоний и трекрезан. Несмотря на формальную принадлежность к различным классам и особенности в механизмах действия, спектры их фармакологической активности во многом перекрываются.

Цель и задачи: на основе комплексных сравнительных исследований объектов различных уровней организации установить общие закономерности и особенности

иммуномодулирующего действия и эффектов, обусловленных метаболитной активностью бемитила, трекрезана и полиоксидония.

Объект и методы исследования. В опытах на лабораторных животных (крысы-самцы линии Wistar массой 250-300 г) с экспериментальной моделью острого бронхолегочного воспаления (интратрахеальное введение под эфирным наркозом 0,1 мл скипидара) изучалась реактивность клеточного звена иммунитета по стандартным показателям: РТМЛ, ФП, ФЧ, ПЗФ, НСТ и ЛКТ. В лимфоцитах и гомогенате тканей легкого биохимически определялось содержание молочной и пировиноградной кислоты, АТФ, АДФ и АМФ. Препараты вводились животным ежедневно в течение пяти суток в дозах 75 мг/кг: полиоксидоний, трекрезан и бемитил – по 25 мг/кг. Исследования выполнены на семи группах – чистый контроль, с экспериментальной моделью острого бронхолегочного воспаления без и при курсовом раздельном и комбинированном (бемитил с трекрезаном или полиоксидонием) применении препаратов. Забор проб осуществлялся на 5 сутки после начала эксперимента. Исследования метаболитного действия *in vitro* выполнены на культурах альвеолярных и перитониальных макрофагов, а также суспензиях лимфоцитов от интактных животных. Наряду с изучением антиоксидантного действия препаратов и их комбинаций по изменению люцигенин-индуцированной хемилиуминесценции (ХЛ), микроспектрофлюориметрически исследовалось изменение редокс-состояния ключевых переносчиков электронов дыхательной цепи митохондрий – восстановленных пиридиннуклеотидов (НАДН) и окисленных флавопротеидов (ФП). Клетки предварительно инкубировали в течение 40 мин в среде с полиоксидонием (500 мкг/мл), бемитилом и трекрезаном (по 30 мкг/мл) и соответствующими комбинациями. Антиоксидантный эффект определялся на хемилиуминометре «Хемилум-1», а микроспектрофлюориметрические исследования проводились с помощью люминесцентного микроскопа с двухлучевой спектрофотометрической насадкой.

Основные результаты. Установлено, что у животных, которым вводились как отдельные препараты, так и их комбинации, к окончанию периода наблюдения происходили существенные сдвиги в сторону нормализации всех определявшихся показателей. По возрастанию иммуномодулирующей активности представляется возможным ранжировать их эффективность в следующем ряду: бемитил, трекрезан, полиоксидоний при максимальной эффективности исследованных комбинаций. Различия между группами, которым вводили бемитил с трекрезаном или полиоксидонием были статистически недостоверны и по большинству показателей не отличались от чистого контроля. Налицо аддитивное или синергическое действие. Результаты биохимических исследований метаболитной активности свидетельствуют о существовании аналогичных зависимостей. Однако установлено, что по энергостабилизирующему действию полиоксидоний достоверно менее эффективен, чем трекрезан. Наибольшая положительная метаболитная активность выявлена для бемитила. При комбинированном применении бемитила с трекрезаном или полиоксидонием наблюдалось возрастание энергостабилизирующей эффективности в лимфоцитах и тканях легких. В опытах *in vitro* установлено: инкубация клеток в среде с исследованными препаратами сопровождалась снижением интенсивности ХЛ, что свидетельствует об их антиоксидантном действии. Наиболее эффективен

бемитил – относительное уменьшение ХЛ перитониальных и альвеолярных макрофагов составляло 62 и 18% соответственно. Антиоксидантное действие трекрезана и полиоксидония менее выражено. Соответствующие показатели были равны 44 и 18% для трекрезана, а для полиоксидония – 40 и 11%. В ходе микроспектрофлюориметрических исследований выявлены существенные различия в метаболитной активности бемитила по отношению к полиоксидонию и трекрезану. Под действием иммуномодуляторов наблюдалось уменьшение флюоресценции ФП и увеличение НАДН. Подобные изменения в соответствии с общепринятыми представлениями отражают перестройки в начальном звене дыхательной цепи митохондрий, в частности, переключение на систему окисления сукцината. Действие бемитила характеризуется увеличением люминесценции окисленных форм ФП и снижением НАДН. Полученные данные свидетельствуют об усилении интенсивности клеточного дыхания и повышении сопряженности окислительного фосфорилирования. Кроме того, при изучении комбинированного воздействия препаратов, установлено: бемитил существенно нивелирует эффекты, характерные для полиоксидония и трекрезана, т.е. проявляет свойства истинного антиоксиданта с выраженной энергостабилизирующей активностью.

Заключение. Полученные данные свидетельствуют о наличии как общих свойств, так и определенных особенностей в феноменологии и механизмах действия исследованных препаратов. Общность проявляется, судя по результатам иммунологических и биохимических исследований, в однонаправленности эффектов иммуномодулирующего действия и положительном влиянии на кислородзависимые процессы у подопытных животных с экспериментальной моделью острого бронхолегочного воспаления. Особого внимания заслуживает то обстоятельство, что применение бемитила в комбинации с иммуномодуляторами характеризуется усилением их эффективности. Результаты исследований *in vitro* отражают определенные особенности механизмов действия бемитила на окислительные процессы в клетках. Препарат проявляет свойства «истинного» антиоксиданта с выраженной энергостабилизирующей активностью, что подтверждено в опытах на животных. Полученные данные позволяют утверждать о синергизме действия данного препарата по отношению к исследованным синтетическим иммуномодуляторам и рекомендовать применение исследованных комбинаций в комплексной иммуномодулирующей, метаболитной и этиотропной терапии при лечении острых бронхолегочных заболеваний.

ИССЛЕДОВАНИЕ ПРОЦЕССА АПОПТОЗА ПРИ РАЗЛИЧНОЙ ПАТОЛОГИИ

Бортникова О.Г., Вагнер В.П.

ГУЗ Областной Консультативно-Диагностический Центр, г. Ростов-на-Дону, Россия

Введение. Апоптоз представляет собой процесс, благодаря которому внутренние или внешние факторы активируют генетическую программу и приводят нежелательные и ущербные клетки к «суициду» и их дальнейшему удалению из тканей. Одним словом, апоптоз – это запрограммированная смерть клетки.

При снижении апоптоза происходит накопление клеток (например, при опухолевом росте). При увеличении апоптоза наблюдается прогрессивное уменьшение количества клеток в ткани (например, при атрофии). Ранняя стадия апоптоза характеризуется изменениями в плазматической мембране клетки. В апоптотических клетках происходит транслокация фосфатидилсерина (PS). Annexin V (Ca²⁺-зависимый фосфолипид-связывающий протеин) используется для определения процентной доли клеток, подвергшихся апоптозу. Он связывается с клетками, экспрессирующими PS. Окрашивание клеток Annexin V обычно проводится одновременно с витальным красителем, таким как пропидиум йодид (PI), что позволяет идентифицировать клетки на ранней стадии апоптоза. При исследовании временной зависимости развития апоптоза прослеживается окрашивание клеток от Annexin V-PI- (живые клетки), Annexin V+PI- (ранняя стадия апоптоза, целостность мембраны сохранена) до финальной стадии – Annexin V+PI+ клетки (поздняя стадия апоптоза и гибель). Прохождение этих стадий свидетельствует об апоптозе.

Цель: изучить показатели апоптоза при различной патологии и определить референтные пределы процентного значения физиологического апоптоза.

Материалы и методы. Нами было обследовано 65 пациентов с различной патологией. Все больные нами условно поделены на 6 групп: I группа – больные с аллергопатологией, II – с аутоиммунными заболеваниями, III – с вирусными инфекциями, IV – с онкопатологией, V – с системными заболеваниями, VI – пациенты с различной соматической патологией и, в том числе, с отягощенным аллергоанамнезом и с персистирующей вирусной инфекцией. Референтную группу составили 20 условно здоровых доноров.

Всем пациентам было проведено исследование иммунного статуса с определением субпопуляций лимфоцитов с использованием моноклональных антител производства Becton Dickinson (BD) и исследование апоптоза при помощи Annexin V-FITC Apoptosis Detection Kit I (BD Pharmingen™). В четырех группах (с аллергопатологией, аутоиммунными, системными и соматическими заболеваниями) было проведено исследование внутриклеточных цитокинов IL-4 и IFN γ . Анализы проводили на лазерном проточном цитофлюориметре FACScan (Becton Dickinson). Данные обрабатывались на компьютере Power Mac G4 пакетом стандартных программ (Simul Set и Cell Quest pro).

Результаты. При анализе данных, полученных в результате обследования референтной группы, мы выявили, что физиологические показатели апоптоза находятся в диапазоне 20-30%, что и приняли условно за референтные пределы в рамках данного исследования. Изучение иммунного статуса пациентов с различной патологией позволило выявить следующие закономерности: в пяти группах (кроме пациентов III группы) было понижено количество CD19⁺-лимфоцитов. Число CD4⁺-лимфоцитов было повышено в четырех группах больных (исключение – пациенты III и VI групп). Количество активированных клеток (HLA-DR⁺) было повышено в III, IV и VI группах. Интересно отметить, что в I и II группе пациентов, у которых уровень апоптоза был повышенным и высоким (45% и 50% в группе), был аналогичным иммунный статус: снижение CD19⁺- и повышение

CD4⁺-лимфоцитов. В двух группах (III и VI) у пациентов в 60-67% случаев определен повышенный и высокий уровень апоптоза. В этой паре нозологических групп больных также отмечали повышение уровня CD3⁺-, CD8⁺- и HLA-DR⁺-лимфоцитов. В IV и V группах количество пациентов с повышенным и высоким апоптозом составило 33% и 38% соответственно. У пациентов отмечали снижение содержания CD19⁺- и повышение количества CD4⁺-, CD16⁺56⁺-лимфоцитов и ИРИ. Что касается цитокинового профиля у обследуемых четырех групп, повышение количества IL-4 наблюдали в I и VI группах. Кроме того, в VI группе больных была повышена продукция IFN γ . В других группах отклонений от референтных пределов нами не выявлено.

Выводы. Понимание механизма запрограммированной клеточной гибели существенно расширяет осознание того факта, что на разных стадиях патологического процесса на фоне более или менее интенсивно протекающей апоптотической гибели лимфоцитов отмечается нарушение соотношения субпопуляций T- и B-лимфоцитов, активация клеток с нарушением иммунорегуляции, что, по-видимому, влечет за собой и искажение цитокинового профиля при атопии и у соматических больных с отягощенным аллергоанамнезом и с сопутствующей персистирующей вирусной инфекцией.

ВЛИЯНИЕ АЛЛОГЕННЫХ ФИБРОБЛАСТОВ НА ПРОДУКЦИЮ ЦИТОКИНОВ МОНОНУКЛЕАРНЫМИ КЛЕТКАМИ *IN VITRO*

Бурда Ю.Е., Нестеренко С.Н., Шевченко С.М., Коробов В.В., Леонова И.Ю., Ершов Д.В.

Курская областная клиническая больница, Россия

Наряду с все более глубоким пониманием молекулярных механизмов функционирования классических участников воспалительных и иммунных реакций, имеющих гомопоэтическое происхождение, в последние годы постепенно возрастает интерес к механизмам вовлечения в указанные процессы других клеток, в частности, эндотелиоцитов, кератиноцитов, фибробластов и т.д. Это связано не только с дальнейшим развитием теории воспаления и иммунитета в целом, уточнением механизмов ограничения этих процессов, репарации и регенерации, но и с многообещающими перспективами клеточной терапии различных заболеваний. Относительно терапевтических возможностей в первую очередь интересным представляется изучение взаимодействия не аутологических, а аллогенных клеток.

Цель и задачи: было проведено изучение влияния аллогенных фибробластов различной степени зрелости и происхождения на продукцию различных цитокинов мононуклеарными клетками *in vitro*.

Материалы и методы. Источниками эмбриональных фибробластов (ЭФ) служили абортусы 6-12 нед., зрелые (взрослые) фибробласты (ВФ) получали из интактных участков легочной ткани, удаленной по поводу онкопатологии. Культуры выращивали по стандартным протоколам, для исследования использовали клетки 5-12 пассажей. Источником мононуклеарных клеток периферической крови (МПК) являлись здоровые добровольцы в возрасте от 20 до 40 лет. МПК

ТАБЛИЦА (к работе Бурды Ю.Е. и соавт.)

| Исследуемый фактор | TNF α | IL-1 β | IFN γ | raIL-1 | IL-10 | TGF- β 1 | IL-4 | IL-2 |
|--------------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| Контроль | 1,00 | 1,00 | 1,00 | 1,00 | 1,00 | 1,00 | 1,00 | 1,00 |
| ЭФ | 0,63 \pm 0,05 | 0,82 \pm 0,05 | 0,74 \pm 0,08 | 1,52 \pm 0,15 | 1,26 \pm 0,12 | 0,74 \pm 0,05 | 1,00 \pm 0,09 | 0,95 \pm 0,06 |
| ВФ | 0,62 \pm 0,06 | 0,78 \pm 0,05 | 0,72 \pm 0,07 | 1,56 \pm 0,21 | 1,15 \pm 0,09 | 0,74 \pm 0,05 | 0,96 \pm 0,05 | 0,92 \pm 0,05 |
| СЭФ | 0,65 \pm 0,05 | 0,80 \pm 0,05 | 0,78 \pm 0,08 | 1,30 \pm 0,13 | 1,21 \pm 0,09 | 0,73 \pm 0,05 | 1,02 \pm 0,08 | 0,97 \pm 0,04 |
| СВФ | 0,65 \pm 0,08 | 0,78 \pm 0,05 | 0,75 \pm 0,08 | 1,57 \pm 0,29 | 1,14 \pm 0,07 | 0,73 \pm 0,05 | 0,97 \pm 0,07 | 0,94 \pm 0,05 |

выделяли на градиенте плотности фиколл-урографин ($\rho = 1,077$ г/л). Продукцию цитокинов изучали в условиях культивирования МПК с аллогенными фибробластами или их супернатантами (СЭФ и СВФ), в полловине опытов – с дополнительной индукцией клеток модельными стимуляторами (ЛПС или ФГА). Оценку продукции цитокинов в культуральной жидкости проводили методом ИФА на наборах фирм «Biosource», «Bender Medsystems», «Цитокин» и «Протеиновый контур». Статобработка – с использованием критериев Ньюмена-Кейлса и Даннета.

Результаты. В итоге получены следующие результаты (в таблице представлены показатели стимулированной продукции цитокинов, $M \pm m$ в % к контролю, $n = 47$): ни в одном опыте не было выявлено статистически значимой разницы между действием на МПК ЭФ, ВФ, СЭФ и СВФ, поэтому в дальнейшем мы будем говорить об общем влиянии фибробластов и их супернатантов на продукцию цитокинов. В отношении спонтанной продукции МПК провоспалительных цитокинов TNF α и IL-1 β имела место тенденция к ее усилению под влиянием исследуемых факторов ($p < 0,05$); отмечено достоверное снижение ЛПС-стимулированной продукции этих цитокинов, а также IFN γ в присутствии фибробластов и их супернатантов ($p < 0,01$). При исследовании влияния фибробластов и продуктов их секреции на выработку МПК противовоспалительных цитокинов установлено, что имело место статистически значимое усиление как спонтанной, так и ФГА-стимулированной продукции IL-10 и raIL-1 ($p < 0,01$), подавление спонтанной и стимулированной продукции TGF- β 1 ($p < 0,01$) и отсутствие влияния на продукцию IL-4. Также было проведено изучение воздействия фибробластов и их супернатантов на продукцию МПК IL-2, каких-либо изменений в опытных лунках по сравнению с контролем не обнаружено.

Заключение. В работах, посвященных возможностям клинического использования аутологичной и аллогенной трансплантации фибробластов, наряду с явным репаративным отмечен и выраженный противовоспалительный и иммуносупрессивный эффект таких трансплантаций, однако механизмы подобного влияния не раскрываются. Благодаря проведенному исследованию появилась возможность говорить о значимом влиянии пересаживаемых клеток на функциональную активность иммунцитов, которое заключается в подавлении продукции провоспалительных цитокинов и стимуляции выработки противовоспалительных цитокинов, особенно в условиях дополнительного действия индукторов воспаления. В то же время имеющая место тенденция к умеренной стимуляции спонтанной про-

дукции провоспалительных цитокинов может в определенной степени объяснить кратковременные острые воспалительные реакции, особенно при системном введении фибробласто-подобных мезенхимальных клеток.

ВЛИЯНИЕ ХЕЛПЕРНЫХ ФРАКЦИЙ НЕЙТРОФИЛОКИНОВ НА ТЕЧЕНИЕ ТОКСИЧЕСКОГО ШОКА ПРИ ЧУМЕ

Васильева Г.И., Киселёва А.К., Беспалова И.А.

ФГУЗ научно-исследовательский противочумный институт, г. Ростов-на-Дону, Россия

Чума, подобно инфекциям, вызванным другими грамотрицательными микроорганизмами, часто осложняется расстройством гемодинамики, падением артериального давления, что связано с выделением токсинов, индуцирующих синтез множества провоспалительных цитокинов (ИЛ-1, ИЛ-6, ФНО α), которые индуцируют синтез простаноидов, лейкотриенов, адгезивных молекул эндотелиальных клеток, в результате чего снижается сердечная функция, падает артериальное давление, сосуды важнейших органов блокируются лейкоцитами, что приводит к расстройству функций других органов и гибели экспериментальных животных [Parillo J., 1993]. Одним из этапов терапии чумного инфекционно-токсического шока является внутривенное введение глюкокортикоидов [Дмитровский А.М., Кугач Н.В., 1994]. Однако клинические испытания показали, что кортикостероиды даже в высокой дозе не предотвращают развития септического шока и не снижают уровень смертности [Bone R., Fisher C., Clemmer T. et al., 1987]. Известно, что лимфоидные клетки крыс, кроликов и обезьян чувствительны к глюкокортикоидным гормонам, а лимфоидные клетки человека и морских свинок – относительно резистентны [Claman H., 1972]. В связи с этим для терапии септического шока предлагают использовать цитокины [Фрейдлин И.С., 1995].

Цель настоящего исследования заключалась в испытании защитных свойств гомологичных хелперных фракций нейтрофилокинов (НК) – цитокинов, синтезируемых нейтрофилами (Нф), – при чумном токсическом шоке на опозитных по чувствительности к глюкокортикоидам экспериментальных животных (белые мыши и морские свинки).

Нами испытаны препараты хроматографических фракций НК, которые обладают наиболее выраженным хелперным действием в отношении киллерной активности макрофагов [Васильева Г.И., Иванова И.А., Тюкавкина С.Ю., 2000]. Биопробным животным

вводили внутривенно в объеме 0,5 мл физиологического раствора смертельную дозу (2 ЛД₅₀) липополисахаридного токсина чумного микроба, полученного по модифицированному нами методу Вестфала [Беспалова И.А. и др. 1995]. Доза липополисахаридного токсина была оттитрована в предварительных опытах и составляла 435 и 692 мкг ЛПС для мышей и свинок соответственно. Двукратные разведения гидрокортизона или испытуемых гомологичных фракций НК в физиологическом растворе вводили зараженным животным подкожно в объеме 0,2 мл и определяли величину ЕД₅₀ гидрокортизона и НК по методу Кербера в модификации Ашмарина И.П., Воробьева А.А. (1962). Заражали по 4 группы животных (4 дозы) по 6 мышей или свинок в каждой. Контрольным группам вводили 2 ЛД₅₀ ЛПС без лечения или наивысшую испытанную дозу гидрокортизона или НК без ЛПС. Гибель животных после введения ЛПС наступала через 2 (мыши) и 3 часа (свинки). НК и гидрокортизон вводили за 30-40 минут до гибели животных в контрольной группе, учет результатов производили через 24 ч. Результаты исследований показали, что НК предотвращали гибель экспериментальных животных от чумного токсического шока. ЕД₅₀ НК для мышей составила 0,41 мкг белка фракции, для свинок – 11,5 мкг.

Таким образом, наши исследования открывают новые, более физиологичные подходы к терапии токсического шока при чуме с помощью гомологичных хелперных фракций нейтрофилокинов – более безопасных корректоров иммунопатологических реакций.

КЛЕТКИ ЭПИТЕЛИАЛЬНОГО СЛОЯ ТОНКОГО КИШЕЧНИКА: СПОСОБНОСТЬ К ВОССТАНОВЛЕНИЮ ГЕМО- И ИММУНОПОЭЗА

Ведина Л.А.¹, Сенников С.В.¹, Труфакин В.А.², Козлов В.А.¹

¹ *ГУ НИИ клинической иммунологии СО РАМН*

² *ГУ НИИ физиологии СО РАМН, г. Новосибирск, Россия*

Актуальность. В настоящее время в многочисленных исследованиях демонстрируется способность ряда соматических стволовых клеток к дифференцировке в клеточные элементы других тканей. Существуют работы, где показано, что многие из стволовых клеток взрослого организма могут обладать гемопоэтическим потенциалом. Способность к образованию гемопоэтических колоний (КОЕс-9) в селезенке летально облученных мышей продемонстрирована и для клеток эпителиального слоя тонкого кишечника. Однако в литературе отсутствуют данные о способности интестинальных клеток восстанавливать гемо- и иммунопоэз у летально облученных реципиентов.

Цель работы: изучить гемо- и иммунопоэзвосстанавливающую активность клеток эпителиального слоя тонкого кишечника у летально облученных мышей-реципиентов.

Материалы и методы. Мыши (СВАхС57В1/6)F1 облучались в дозе 8,5-9 Гр. Первой опытной группе внутривенно вводились клетки эпителиального слоя

тонкого кишечника (1,5 x 10⁶ клеток/мышь), второй опытной группе – клетки костного мозга (1,5 x 10⁴ клеток/мышь). При этом подбор доз вводимых клеток костного мозга был осуществлен таким образом, чтобы количество образованных колоний в селезенке было равно количеству колоний (КОЕс-9), образующихся при трансплантации клеток кишечника. В качестве контрольной группы использовались необлученные мыши. Через 1, 3 и 6 месяцев после трансплантации были изучены в динамике численность популяции клеточных элементов периферической крови и функциональная активность клеток иммунной системы. В качестве оценки клеточного звена иммунитета нами была выбрана реакция гиперчувствительности замедленного типа (ГЗТ). Изучение динамики гуморального иммунитета проводилось на модели первичного IgM иммунного ответа на Т-зависимый антиген (эритроциты барана).

Основные результаты. Установлено, что полное восстановление численности популяции клеточных элементов периферической крови (лейкоцитов, эритроцитов, тромбоцитов) у реципиентов первой группы наблюдалось только через 6 месяцев после трансплантации клеток эпителиального слоя тонкого кишечника. Восстановление общего числа лейкоцитов происходило уже через 3 месяца после трансплантации, количество эритроцитов и тромбоцитов достигало нормативных значений к 6 месяцу. В опытной группе мышей с трансплантацией клеток костного мозга также через 6 месяцев наблюдалось восстановление до нормального уровня числа лейкоцитов, тромбоцитов и эритроцитов. Однако эритроидный росток и показатель гематокрита в этой группе оставался статистически сниженным по отношению к опытной группе с трансплантацией клеток эпителиального слоя тонкого кишечника. Полученные данные можно связать с высоким пролиферативным потенциалом клеток кишечника, благодаря чему происходит более интенсивное восстановление всех ростков кроветворения. При изучении клеточного иммунитета летально облученных мышей, которым была выполнена трансплантация клеток кишечника (костного мозга), было выявлено достоверное снижение выраженности реакции ГЗТ в обеих опытных группах в течение первых 3 месяцев. Уровень клеточного ответа не отличался от показателя контрольной группы необлученных мышей только через 6 месяцев после трансплантации. Статистически значимых различий между опытными группами выявлено не было. При изучении гуморального иммунитета было показано, что в течение первых 3 месяцев после трансплантации в обеих опытных группах наблюдалось статистически значимое снижение абсолютного и относительного числа антителообразующих клеток (АОК) по сравнению с данными контрольной группы. Однако менее выраженный гуморальный ответ наблюдался у реципиентов с трансплантацией клеток костного мозга по сравнению с летально облученными мышами, которым трансплантировали клетки эпителиального слоя тонкого кишечника. Восстановление гуморального иммунитета в обеих опытных группах происходило лишь через 6 месяцев после трансплантации, когда уровень гуморального иммунного ответа не отличался от контрольной группы необлученных мышей.

Заключение. Таким образом, полученные нами данные свидетельствуют о высоком гомеопэтическом потенциале интестинальных клеток и указывают на возможность использования клеток эпителиального слоя тонкого кишечника в качестве модели изучения феномена «пластичности» соматических стволовых клеток.

ВЫЯВЛЕНИЕ ПОСТИНФЕКЦИОННЫХ РЕАКЦИЙ CD4⁺Т-КЛЕТОК, СПЕЦИФИЧНЫХ ДЛЯ *M. TUBERCULOSIS*, НА МОДЕЛИ ТРАНСГЕННЫХ МЫШЕЙ

Винслоу Гэри^{1,2}, **Рейли Уильям**², **Калайаг Марк**¹, **Уиттмер Сьюзен**², **Хантингтон Дженнифер**¹, **Вудлэнд Дэвид**²

Центр Уодсворд¹, Олбани, Нью-Йорк, 12208
и Институт Трудо², Сэйранак Лэйк, Нью-Йорк, 12983, США

Ранее нами было показано, что CD4⁺Т-клетки, секретирующие IFN γ и специфичные для эпитопа IA^b/ESAT-6 (1-20), выявляются посредством ELISPOT, начиная с 14-21 суток после инфицирования *M.tb.* (1,5-2,0% CD4⁺ клеток в легком) и сохраняются на длительный период в течение хронической инфекции (J. Immunol., 170: 2046). Однако эти исследования потребовали определения активации Т-клеток *in vitro* для выявления антиген-специфических Т-клеток и не позволили провести прямой анализ реакций Т-клеток *in vivo*. В продолжение этих исследований мы разработали трансгенную линию мышей, специфичную по IA^b/ESAT-6 (1-20) CD4⁺Т-клеткам. Альфа- (V альфа 9D3) и бета- (V бета 3) цепи TCR клонировали из гибридомной линии, специфичной по IA^b/ESAT-6 (1-20), и экспрессировали *in vivo* под контролем промотора CD2 человека, для которого было ранее показано функционирование у мышей. Были получены исходные мыши с высокой частотой трансгенных Т-клеток. Эти Т-клетки проявляли высокие уровни экспрессии маркера активации CD69 после стимуляции *in vitro* специфическим пептидом, а также внутриклеточную экспрессию IFN γ при помощи окраски внутриклеточного цитокина. Для определения возможности размножения трансгенных Т-клеток *in vitro* 1 x 10⁶ клеток переносили мышам C57BL/6 за 1 день до заражения *M.tb.* в виде аэрозоля (около 200 легочных КОЕ). Трансгенные Т-клетки проходили выраженную пролиферацию и накапливались в лимфоидных тканях и легких до частот порядка 10% CD4⁺Т-клеток на 18-й день после инфицирования. Введение трансгенных Т-клеток приводило к снижению бактериальной инфекции примерно на 0,5 log₁₀, вероятно, в связи с повышением частоты предшественников «наивных» Т-клеток до инфекции. Последующие исследования касаются уточнения сроков прохождения активации и деления трансгенных CD4⁺Т-клеток, а также фенотипических характеристик этих клеток в ходе иммунных реакций. Эти исследования, которые прольют свет на продукцию и поддержание защитного ответа CD4⁺Т-клеток как при острой, так и при хронической инфекции, приведут к лучшему пониманию факторов, которые ведут к генерации защитного иммунитета у человека.

DETECTION OF MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS-SPECIFIC CD4 T-CELLS RESPONSES FOLLOWING INFECTION USING A TRANSGENIC MOUSE MODEL

Gary Winslow^{1,2}, **William Reiley**², **Mark Calayag**¹, **Susan Wittmer**², **Jennifer Huntington**¹, **and David L. Woodland**²

Wadsworth Center¹, Albany, NY, 12208, and Trudeau Institute², Saranac Lake, NY, 12983, USA

We previously demonstrated that IFN γ -secreting CD4⁺T-cells specific for the IA^b/ESAT-6(1-20) epitope were first detected by ELISPOT 14-21 days post *M.tb.*-infection (1.5-2.0% of lung CD4⁺T-cells), and were maintained for an extended period during chronic infection (J. Immunol. 170: 2046). These studies required *in vitro* T-cell activation assays to detect the antigen-specific T-cells, however, and did not allow a direct analysis of T-cell responses *in vivo*. As an extension of these studies, we have developed an IA^b/ESAT(1-20)-specific CD4⁺T-cell transgenic mouse strain. The TCR alpha (V alpha 9D-3) and beta (V beta 3) chains were cloned from an IA^b/ESAT(1-20)-specific T-cell hybridoma line, and were expressed *in vivo* under the direction of the human CD2 promoter which has previously been shown to function in the mouse. Founder mice were obtained that expressed high frequencies of transgenic T-cells. These T-cells exhibited high surface expression of the activation marker CD69 following *in vitro* stimulation with specific peptide, and intracellular expression of IFN γ , using an intracellular cytokine staining assay. To determine if the transgenic T-cells underwent expansion *in vivo*, 1 x 10⁶ cells were transferred to C57BL/6 mice one day prior to aerosol inoculation with *M.tb.* (approximately 200 lung CFU). The transgenic T-cell underwent marked proliferation and accumulated in lymphoid tissues and lungs at frequencies as high as 10% of CD4 T-cells on day 18 post-infection. Introduction of the transgenic T-cells led to an approximately 0.5 log₁₀ reduction in bacterial infection, presumably a result of increasing the precursor frequency of naive T-cells prior to infection. Ongoing studies are addressing the exact time that the transgenic CD4 T-cells undergo activation and cell division following infection, and are addressing the phenotypic characteristics of these cells during the immune responses. These studies, which will shed light on the generation and maintenance of the protective CD4 T-cell response during both acute and chronic infection, will lead to a better understanding of the factors that lead to the generation of protective immunity in humans.

РАЗРАБОТКА МОДЕЛИ РАКА МОЛОЧНЫХ ЖЕЛЕЗ, ВЫЗВАННОГО ГИПЕРЭКСПРЕССИЕЙ ГЕНА WNT-1

Вискова Н.¹, **Вартиковская Л.**², **Свирицкая Е.**¹

¹ Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва, Россия

² Национальный институт рака, Бетесда, США

Введение. Опухоли эпителиального происхождения являются наиболее частой причиной смерти от рака. К сожалению несмотря на прогресс, достигнутый в радио и химиотерапии рака, метастатические формы рака молочных

желез не лечатся. Необходим поиск новых подходов и препаратов для лечения этих заболеваний, для чего требуется создание новых моделей рака на животных. В настоящее время практически нет охарактеризованных моделей спонтанного рака молочной железы на мышах. Недавно в США были получены трансгенные мыши, в клетках которых гиперэкспрессирован белок wnt-1. Wnt является секретиремым белком, связывающимся с рецептором на поверхности клеток, что приводит к стабилизации и транслокации белка бета-катенина в ядро, где последний связывается с ядерными транскрипционными факторами. Стабилизация бета-катенина обнаружена в > 50% случаев рака молочных желез у человека, хотя мутации wnt пути не были обнаружены. Снижение активности ингибиторов wnt и повышенный уровень экспрессии бета-катенина ассоциированы с плохим прогнозом при раке молочных желез. Трансгенная экспрессия wnt-гена под промотором MMTV у мышей ведет к гиперплазии молочных желез и возникновению спонтанных опухолей.

Цель. Целью данной работы являлось создание перениваемой *in vivo* модели wnt-1 рака молочных желез, а также получение иммортализованных линий wnt-1 и их фенотипирование.

Методы. Клетки wnt-1 от трансгенных животных были получены в США. Интактным или летально облученным и восстановленным нормальным костным мозгом мышам линии C57BL/6 вводили клетки wnt-1 подкожно (п/к) либо в жировую подушку (MFP), ассоциированную с молочной железой. Для получения клеточных линий опухоли гомогенизировали, рассеивали на чашки и культивировали до получения адгезионных клеток. Через 2 суток удаляли все неприлипшие клетки, а прилипшую фракцию снимали трипсином, переводили в свежую среду, и рассеивали в низкой плотности на чашки. Колонии снимали трипсинизацией клеток под цилиндром, ограничивающим колонию. Полученные клетки культивировали до получения устойчивых линий. Фенотипирование клеток проводили с помощью антител к маркерам эпителиальных, мезенхимальных и лимфоцитарных клеток с помощью проточной цитометрии.

Результаты. Показано, что wnt-1 клетки растут как в облученных, так и интактных мышах, как при п/к, так и MFP введении. При введении 10^5 /мышь клеток опухоли формировались у 50% животных, тогда как при введении 10^6 /мышь опухоли возникли у 95% мышей. Из опухолей, полученных в первом пассаже, готовили культуры эпителиальных клеток. В результате клонирования и длительного культивирования было получено три типа клеток: 2 линии фенотипически различающихся карцином и 1 линия фибросаркомы, что подтверждено гистологически. Было показано, что практически 100% клеток wnt-1 карцином экспрессировали маркер эпителиальных клеток ер-САМ, а также высокий уровень Sca-1 и CD24 антигенов. До 50% клеток карцином экспрессировали Н-2К, CD44 антигены и цитокератин 18. Клетки фибросаркомы, напротив, были отрицательны по ер-САМ, положительны по виментину и 50% экспрессировали антигены Sca-1 и CD24.

Заключение. Были получены и охарактеризованы три новые клеточные линии рака молочных желез wnt-1, а также разработана модель этого рака *in vivo*, что в дальнейшем позволит их использовать для поиска новых подходов к терапии рака молочных желез.

ОЦЕНКА ЦИТОКИНОВОГО СТАТУСА ОРГАНИЗМА ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ ЖИВОТНЫХ ПРИ МОДЕЛИРОВАНИИ ИНФЕКЦИОННОГО ПРОЦЕССА ВОЗБУДИТЕЛЯМИ ВНУТРИБОЛЬНИЧНЫХ ИНФЕКЦИЙ

Водянова Т.В.¹, Шибаева М.А.², Елисеев Ю.Ю.¹, Емельянова Н.В.¹

¹ Саратовский государственный медицинский университет, г. Саратов, Россия

² Саратовский государственный университет им Н.Г. Чернышевского, г. Саратов, Россия

Гнойно-воспалительные заболевания, вызываемые возбудителями внутрибольничных инфекций (ВВБИ), составляют значительный процент инфекционных осложнений в клинической практике. Актуальность проблемы обусловлена также устойчивостью к широкому спектру антибиотиков выделяемых клинических штаммов ВВБИ, которые при тяжелых и генерализованных формах инфекции могут приводить к летальному исходу. Персистенция патогена возникает как вследствие биологических особенностей возбудителя, так и неадекватности иммунного ответа. Известно, что при инфекционном процессе цитокиновая сеть резко активизируется, а баланс между про- и противовоспалительными цитокинами во многом определяет характер течения и исход гнойно-септических заболеваний. Соответственно управление цитокиновым балансом рассматривается в настоящее время как мишень терапевтических воздействий при лечении таких инфекций.

Ранее в наших исследованиях при моделировании процесса фагоцитоза ВВБИ *in vitro* было показано, что степень завершенности этого процесса и индукция цитокинов неоднозначны и зависят от биологических характеристик возбудителя. Для разработки адекватных методов лечения и профилактики внутрибольничных инфекций представляло интерес оценить изменения цитокинового статуса организма при моделировании инфекционного процесса некоторыми ВВБИ.

Материалы и методы. В работе использовали клинические штаммы бактерий, выделенные как ВВБИ: *Serratia sp.*, *Citrobacter sp.*, *Enterobacter agglomerans* 9, которые характеризовались устойчивостью к 3-5 широко используемым антибиотикам. Инфекционный процесс моделировали на беспородных белых мышах-самцах массой 18-20 г введением внутримышечно или внутрибрюшинно взвеси суточных культур клинических штаммов бактерий в физиологическом растворе хлорида натрия в объеме 0,2 мл с концентрацией 5 млн м.к./мл (6 опытных групп по 10 животных); контрольным мышам вводили аналогично 0,2 мл физиологического раствора (2 контрольные группы по 6 животных). Определяли через 1, 6, 12 и 24 ч после заражения содержание в сыворотке крови цитокинов: ИЛ-1α, ИЛ-6, ИЛ-8, ФНОα, ИФНα в ИФА с тест-системами на основе моноклональных антител (наборы реактивов ООО «Цитокин», Санкт-Петербург; НПО ЗАО «Вектор-БЕСТ», г. Новосибирск).

Результаты. При моделировании инфекционного процесса введением клинических штаммов бактерий внутримышечно отмечена однотипная динамика увеличения в сыворотке крови экспериментальных животных содержания ИЛ-1α и ФНОα от 1 до 12 часов эксперимен-

та. Для ИЛ-1 α выявлено некоторое уменьшение определяемых концентраций к 24 часу, не достигающих однако контрольных значений. Содержание ИЛ-6 и ИФН- α достоверно превышало контроль через 12 и 24 ч после заражения животных. Внутривидовое введение мышам взвеси суточных культур бактерий *Serratia sp.* и *Citrobacter sp.* сопровождалось резкой индукцией ИЛ-1 α и ФНО α , содержание которых в 3-5 раз превышало контрольные значения в сыворотке крови через 12 и 24 ч. Концентрация ИЛ-6 была достоверно выше контрольных значений через 6 и 12 ч, а ИФН α – через 6 и 24 ч. При заражении животных внутривидово клиническим штаммом *E. agglomerans* 9 отмечено динамичное возрастание к 24 часу инфекционного процесса содержания ИЛ-1 α , значительно превышающего контроль. Концентрация ФНО α увеличивалась к 6 часу и снижалась к 24 часу, оставаясь при этом выше исходных значений. Содержание ИЛ-6 в сыворотке крови животных превышало контрольные показатели через 6 и 12 ч после заражения. Отмечено также появление в сыворотке крови зараженных клиническим штаммом *E. agglomerans* 9 мышей ИЛ-8 в небольших концентрациях через 12 и 24 ч инфекционного процесса. Выявлен также незавершенный характер фагоцитоза ВВБИ перитонеальными макрофагами в организме инфицированных животных, и содержание в перитонеальном экссудате значительного числа разрушенных и апоптотических фагоцитов.

Таким образом, проведенные исследования позволили выявить особенности изменения цитокинового статуса организма экспериментальных животных при разных способах проникновения ВВБИ, видовой принадлежности возбудителя и его антигенных характеристик.

ИММУНОГЕННЫЕ СВОЙСТВА СЕКРЕТИРУЕМЫХ БЕЛОКСОДЕРЖАЩИХ АНТИГЕНОВ *KLEBSIELLA PNEUMONIAE*

Воюшин К.Е.¹, Доненко Ф.В.¹, Курбатова Е.А.², Киселевский М.В.¹, Егорова Н.Б.², Грубер И.М.², Ахматова Н.К.², Семёнова И.Б.³

¹ ГУ РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН, Москва, Россия

² ГУ НИИ вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова РАМН, Москва, Россия

³ ГУ НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф. Гамалеи РАМН, Москва, Россия

Введение. На протяжении многих лет проводились исследования по получению различных антигенов *Klebsiella pneumoniae* (капсульный полисахарид, липополисахарид, О-антиген и др.) и изучению их иммуногенных свойств. Несмотря на наличие протективной активности у этих препаратов, коммерческих противоклебсиеллезных вакцин на их основе до сих пор нет. Наше внимание привлекли секретлируемые белоксодержащие компоненты *K. pneumoniae*, представленные ферментами (протеазы, гликозидазы и др.), токсинами, гемолизинами, белками теплового шока и др., высокая консервативность аминокислотной последовательности которых, открывает новую область их применения для получения антигенов с внутри- и, возможно, межвидовой перекрестной протективной активностью.

Цель: получение секретлируемых белоксодержащих антигенов *K. pneumoniae* и изучение их иммуногенных свойств.

ТАБЛИЦА. ВНУТРИВИДОВАЯ ПЕРЕКРЕСТНАЯ ПРОТЕКТИВНАЯ АКТИВНОСТЬ ПРЕПАРАТОВ ИЗ ШТАММОВ *K. PNEUMONIAE* ПОСЛЕ 2-КРАТНОЙ ИММУНИЗАЦИИ (к работе Воюшина К.Е. и соавт.)

| № группы | Штамм для получения препарата | М.м препарата, kDa | Иммунизирующая доза препарата, мкл | Заражение штаммами <i>K. pneumoniae</i> через 14 суток после 2-й иммунизации | | | | | |
|----------|-------------------------------|--------------------|------------------------------------|--|-------------------|-----------|---------------------|-------------------|-----------|
| | | | | K2 в дозе 15,8 LD50 | | | K16 в дозе 2,3 LD50 | | |
| | | | | Выжило | | ED50, мкл | Выжило | | ED50, мкл |
| | | | | Абс. | % \pm m | | Абс. | % \pm m | |
| 1 | K2 | < 30 | 1 | 0/10 | 0 | Н.о. | 0/10 | 0 | > 100 |
| | | | 10 | 0/10 | 0 | | 4/8 | 50,1 \pm 17,7 | |
| | | | 100 | 3/10 | 30,0 \pm 14,5 | | 3/5 | 60,0 \pm 22,0 | |
| 2 | K2 | 30-50 | 1 | 1/10 | 10,0 \pm 9,5 | 3,2 | 4/10 | 40,0 \pm 15,5 | 8,0 |
| | | | 10 | 10/10 | 100,0 \pm 6,0** | | 6/10 | 60,0 \pm 15,5* | |
| | | | 100 | 9/10 | 90 \pm 9,5** | | 6/10 | 60,0 \pm 15,5* | |
| 3 | K16 | 30-50 | 1 | 3/10 | 30,0 \pm 14,5 | 60,0 | 3/10 | 30,0 \pm 14,5 | 8,0 |
| | | | 10 | 3/10 | 30,0 \pm 14,5 | | 6/10 | 60,0 \pm 15,5* | |
| | | | 100 | 1/10 | 10,0 \pm 9,5 | | 7/10 | 70,0 \pm 14,5** | |
| 4 | 204 | 30-50 | 1 | 1/10 | 10,0 \pm 9,5 | 25 | 3/8 | 37,5 \pm 15,3 | 2,5 |
| | | | 10 | 5/10 | 50,0 \pm 15,8* | | 6/8 | 75,0 \pm 13,7** | |
| | | | 100 | 5/10 | 50,0 \pm 15,8* | | 8/8 | 100,0 \pm 8,7** | |
| 5 | Не вакцинированные | – | – | 1/10 | 10,0 \pm 9,5 | | 1/10 | 10,0 \pm 9,5 | |

Примечание. Достоверность разности между процентом выживших животных в опытных группах и в контроле, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$.

Материалы и методы. Для получения секретируемых белоксодержащих фракций использовали штаммы *K. pneumoniae* (K2, K16, 204), характеризующиеся различной степенью вирулентности (LD50 от 31,6 микр.клеток до 250 x 10⁶ микр.клеток). Штаммы культивировали в полусинтетической среде, микробные клетки инактивировали и отделяли центрифугированием. Полученную надосадочную жидкость подвергли последовательной ультрафильтрации через мембраны YM-100; 50; 30 и 10 kDa. Протективную активность полученных фракций изучали на белых беспородных мышах, которых вакцинировали 2-кратно с интервалом 14 суток и заражали гомологичным или гетерологичными штаммами *K. pneumoniae* через 2 недели после последней иммунизации.

Результаты. Установлено, что протективной активностью обладали препараты с М.м. 30-50 kDa. Препараты с М.м. < 30 и > 50 kDa были неиммуногенными. Выживаемость мышей, иммунизированных фракцией 30-50 kDa, полученной из наиболее вирулентного штамма *K. pneumoniae* K2, при заражении гомологичным К-типом в дозе 178 LD50 составляла 100%. Установлено, что препарат *K. pneumoniae* K2 30-50 kDa, а также препараты этой же молекулярной массы, полученные из других исследованных штаммов – K16 и 204, обладали внутривидовой перекрестной протективной активностью (табл.). Препарат *K. pneumoniae* K2 с М.м. 30-50 kDa защищал от заражения штаммом K16 в дозе 2,3 LD50 – 60% мышей.

Наличие общих белоксодержащих антигенов у штаммов *K. pneumoniae* K2, K16 и 204 было подтверждено при проведении электрофореза в полиакриламидном геле. При этом были выявлены общие мажорные белковые полосы в областях 35 и 40 kDa. Тот факт, что белоксодержащие соединения этой молекулярной массы участвуют в защите от инфекции, подтвердился в реакции иммуноблоттинга с антителами, полученными после иммунизации мышей препаратом *K. pneumoniae* K2 30-50 kDa.

Методом проточной цитофлюориметрии доказано, что полученная из культуральной надосадочной жидкости фракция с М.м. 30-50 kDa, обладающая иммуногенной активностью, относится к секретируемым микробными клетками соединениям, а не является продуктом их лизиса. При протеолитическом разру-

шении белковой составляющей протективная активность фракции 30-50 kDa утрачивалась.

После 2-кратной иммунизации мышей фракцией с М.м. 30-50 kDa отмечали существенное нарастание уровня антител, тестируемых в ИФА, а сыворотка крови иммунизированных мышей при пассивном переносе защищала от заражения 90% животных при гибели 100% мышей в контроле.

Через 2 часа после иммунизации фракцией 30-50 kDa в сыворотке крови мышей повышался уровень цитокинов IL1 β , TNF α , IL-6, IL-10. В культуре дендритных клеток, полученных из клеток костного мозга мышей, под действием фракции 30-50 kDa, происходило увеличение синтеза TNF α , IL-6, IL-12.

Заключение. Секретируемые белоксодержащие фракции *K. pneumoniae* с М.м. 30-50 kDa можно рассматривать как основу для получения противоклебсиеллезных вакцин. Предложенный способ получения белоксодержащих фракций *K. pneumoniae* может быть использован для получения протективных антигенов из других видов микроорганизмов.

ВЛИЯНИЕ ПРОФЕТАЛЯ НА ИНТЕНСИВНОСТЬ ТКАНЕСПЕЦИФИЧЕСКОГО ИММУННОГО ОТВЕТА ПРИ ПРОНИКАЮЩЕМ РАНЕНИИ ГЛАЗА КРЫС

Гаврилова Т.В., Файзрахманов Р.Р., Черешнева М.В., Сибиряк С.В., Шилов Ю.И., Родионов С.Ю.

Институт иммунологии и физиологии УрО РАН, г. Екатеринбург

Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН, г. Пермь, Россия

Особенностью проникающего ранения глаза является опасность развития аутоиммунного повреждения здорового глаза. В этой связи разработка терапевтических подходов, позволяющих предотвратить формирование иммунной агрессии, представляется важной задачей. В настоящее время созданы препараты, характеризующиеся иммунорегуляторной активностью, т.е. способные в зависимости от условий как стимулировать, так

ТАБЛИЦА. ВЛИЯНИЕ ТРАВМЫ, ПРОФЕТАЛЯ И СТАНДАРТНОЙ ТЕРАПИИ НА ЧАСТОТУ ВЫЯВЛЯЕМОСТИ АНТИТЕЛ К АУТОАНТИГЕНАМ (к работе Гавриловой Т.В. и соавт.)

| Группа | Экспериментальное воздействие | Число животных | Частота выявляемости антител к аутоантигенам, % | | | | |
|--------|--|----------------|---|-----------------------|------------|----------------------------|-------------------------------------|
| | | | BCP-54 | α -кристаллину | S-антигену | АТ одновременно ко всем АГ | С «+» реакциями хотя бы к одному АГ |
| 1 | ПРГ | 10 | 30 | 30 | 30 | 20 | 50 |
| 2 | ПРГ + стандартная терапия | 10 | 30 | 20 | 20 | 10 | 50 |
| 3 | ПРГ + профеталь (29 сут) + стандартная терапия | 10 | 20 | 10 | 0 | 0 | 30 |
| 4 | ПРГ + профеталь | 10 | 10 | 20 | 10 | 0 | 20 |
| 5 | ПРГ + профеталь (13 сут) + стандартная терапия | 10 | 20 | 20 | 10 | 10 | 30 |
| 6 | Интактные крысы | 10 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |

и подавлять иммунные реакции. Подобной активностью обладает сывороточный белок альфа-фетопротеин, на основе которого создан препарат – профеталь.

Цель работы: оценить влияние профеталья на формирование иммунного ответа к тканеспецифическим белкам при проникающем ранении глаза крыс.

Материалы и методы. Эксперимент выполнен на 60 половозрелых крысах-самцах популяции Wistar. Животным под местной анестезией наносили проникающее ранение правого глаза. Были сформированы следующие группы животных: 1-я – проникающее ранение глаза (ПРГ) и последующее введение 0,85% раствора NaCl аналогично 3-й группе; 2-я – ПРГ с последующей стандартной терапией (дексаметазон, ампициллин, гентамицин, диклофенак натрия), начиная лечение через 365 минут от момента ПРГ и заканчивая на 13-е сутки эксперимента; 3-я – ПРГ с последующей стандартной терапией по той же схеме и одновременным введением профеталья (1,0 мкг/кг) вплоть до 29 суток, 4-я – ПРГ с последующим введением профеталья до 29 суток включительно, 5-я – ПРГ с последующей стандартной терапией и одновременным введением профеталья вплоть до 13-х суток. Контролем (6-я группа) при оценке органоспецифических иммунных реакций служили интактные животные. По окончании эксперимента, на 30-е сут, методом твердофазного иммуноферментного анализа (ИФА) в плазме крови определяли наличие антител (АТ) к антигенам (АГ): ретинальному S-антигену, корнеальному белку ВСП-54 и α -кристаллину хрусталика.

Основные результаты. В контрольной группе крыс у 30% животных при проведении ИФА выявлялись аутоантитела к корнеальному белку (ВСП-54), α -кристаллину хрусталика и ретинальному S-антигену, что свидетельствует о формировании аутоиммунной реакции и является прогностически неблагоприятным. В группе животных, получавших стандартную терапию (2), антитела против ВСП-54 выявлены у 30% крыс, а аутоантитела к ретинальному аррестину и α -кристаллину – у 20% животных. Введение профеталья как в виде монотерапии, так и в комбинации с препаратами стандартной терапии приводило к снижению интенсивности аутоиммунной реакции. Так, при монотерапии профеталем (4) только у 10% травмированных крыс выявлялись аутоантитела против корнеального белка и S-антигена, а у 20% животных – против кристаллина хрусталика. При одновременной 13-дневной стандартной терапии в сочетании с профеталем у 20% травмированных крыс выявлялись аутоантитела против корнеального белка и кристаллина, а у 10% животных, – против ретинального S-антигена. Наиболее эффективным оказалось одновременное проведение стандартной терапии в сочетании с профеталем с последующим продолжением терапии профеталем (3). В этом случае аутоантитела против корнеального белка выявлялись у 20% животных, против кристаллина у 10% крыс, а аутоантитела против S-антигена выявлено не было.

Заключение. Профеталь при проникающем ранении глаза обеспечивает возможность снижения иммунного контроля и угрозу развития аутоиммунной реакции; выявлен максимальный защитный эффект в отношении формирования иммунного ответа к S-антигену, – наиболее «увеитогенному» белку глаза.

Работа поддержана грантами РФФИ 06-04-48897 и 06-04-49001 Интеграционного проекта УрО РАН совместно с СО РАН.

ИНТЕРЛЕЙКИН-2 ОПРЕДЕЛЯЕТ ВЕЛИЧИНУ CD4⁺T-КЛЕТОЧНОГО ОТВЕТА *IN VITRO*, РЕГУЛИРУЯ СКОРОСТЬ ОТМИРАНИЯ КЛЕТОК: АНАЛИЗ ДАННЫХ CFSE С ПОМОЩЬЮ МАТЕМАТИЧЕСКОГО МОДЕЛИРОВАНИЯ

Ганусов В.В.^{1,2}, Милутинович Д.^{2,3}, Де Бур Р.²

¹ Красноярский научный центр, г. Красноярск, Россия

² Utrecht University, Utrecht, The Netherlands

³ Duke University, Durham, USA

Интерлейкин 2 (ИЛ-2) является одним из важнейших факторов, влияющих на динамику Т-лимфоцитов как *in vitro*, так и *in vivo*. Тем не менее, несмотря на исследования, проводимые в течение нескольких десятилетий, до сих пор не известно, как именно ИЛ-2 влияет на популяционную динамику лимфоцитов: изменяет скорость их деления и/или скорость их отмирания. В данной работе мы проанализировали данные по динамике CD4⁺T-лимфоцитов, меченых с CFSE и стимулированных *in vitro* анти-CD3 антителами при различных (внешних) концентрациях ИЛ-2. Оценка скоростей деления и отмирания лимфоцитов в экспериментах с меткой CFSE не является тривиальным и требует использования математических моделей. В результате анализа со специально разработанными математическими моделями нами показано, что для адекватного описания динамики Т-лимфоцитов при низких концентрациях ИЛ-2 скорость отмирания Т-клеток должна возрастать с числом клеточных делений. ИЛ-2 практически не влиял на среднее время деления лимфоцитов. При снижении концентрации ИЛ-2: 1) меньшее число Т-лимфоцитов было вовлечено в генерацию иммунного ответа; 2) увеличивалась стохастичность клеточного деления; 3) увеличивалась степень возрастания скорости отмирания Т-лимфоцитов с числом клеточных делений. Таким образом, наш анализ показал, что основной эффект ИЛ-2 на динамику CD4⁺T-лимфоцитов *in vitro* заключается в изменении скорости отмирания лимфоцитов, а не в изменении скорости их деления.

РОЛЬ МИЕЛОПЕПТИДОВ В РЕГУЛЯЦИИ ЛПС-ИНДУЦИРОВАННОЙ ПРОДУКЦИИ IL-1 β И TNF α МОНОНУКЛЕАРАМИ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ

Гейн С.В., Гаврилова Т.В., Черешнев В.А.

Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН, г. Пермь

Пермский государственный университет, г. Пермь, Россия

Костномозговые пептиды (миелопептиды) представляют собой группу регуляторных пептидных факторов,

выделенных из супернатанта культуры клеток костного мозга и обладающих широким спектром иммунорегуляторной активности. На их основе был создан лекарственный препарат миелопид, представляющий собой нативную смесь миелопептидов. При разделении смеси были выделены и охарактеризованы шесть отдельных пептидных фракций, обладающих самостоятельным и более избирательным иммуномодулирующим действием.

Цель настоящей работы: изучение влияния миелопептидов МП-1, МП-3, МП-5 и МП-6 на продукцию IL-1 β и TNF α мононуклеарами периферической крови, индуцированную ЛПС. Объектом исследования служили лейкоциты периферической венозной крови здоровых мужчин-добровольцев в возрасте от 22 до 30 лет. Мононуклеары выделяли на градиенте плотности фиколл-верографин и культивировали в течение 24 ч в полной питательной среде 199. Липополисахарид (ЛПС) 0,1 мкг/мл вносили в культуры одновременно с миелопептидами. МП-1 и МП-3 исследовали в диапазоне концентраций 10⁻⁶, 10⁻⁸, 10⁻¹⁰ г/мл, МП-5 и МП-6 – 10⁻⁷ г/мл. Супернатанты клеточных культур хранили в замороженном состоянии при –20°C. Установлено, что все исследуемые миелопептиды угнетают ЛПС-индуцированную продукцию IL-1 β . В отношении TNF α супрессивный эффект был менее выражен и проявлялся только у МП-1, МП-5 и МП-6. МП-3 на уровень TNF α не влиял. На спонтанную продукцию исследуемых цитокинов миелопептиды не влияли. Таким образом, в работе показана способность миелопептидов угнетать синтез провоспалительных цитокинов, как следствие, нивелировать провоспалительный эффект ЛПС и оказывать балансирующее влияние на развитие иммунных реакций.

РОЛЬ β -ЭНДОРФИНА В РЕГУЛЯЦИИ ПРОДУКЦИИ IL-1 β И IL-8

Гейн С.В., Горшкова К.Г.

Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН, г. Пермь, Россия

Пермский государственный университет, г. Пермь, Россия

Цель работы – оценка влияния β -эндорфина на продукцию IL-1 β и IL-8 моноцитами и нейтрофилами периферической крови. Объектом исследования служили лейкоциты периферической венозной крови здоровых мужчин-добровольцев в возрасте от 22 до 30 лет. Выделение фракции моноцитов и нейтрофилов производили стандартными методами. Выделенные фракции культивировали в полной питательной среде RPMI 1640 в 24-луночных планшетах Costar (США) 1 x 10⁶ клеток в мл в течение 24 ч в присутствии фитогемагглютинаина 2,5 мкг/мл и липополисахарида 0,1 мкг/мл. Супернатанты клеточных культур хранили в замороженном состоянии при – 20°C.

Установлено, что ЛПС во фракции лейкоцитов на синтез IL-1 β не влиял, в то же время уровень IL-8 в ответ на ЛПС усиливался. Добавление β -эндорфина активировало спонтанную и ЛПС-индуцированную

продукцию IL-1 β в концентрациях 10⁻⁷ и 10⁻¹¹ М, одновременно наблюдалось угнетение ЛПС-индуцированной продукции IL-8. В присутствии субоптимальной дозы ФГА продукция исследуемых цитокинов как в присутствии, так и в отсутствии β -эндорфина не изменялась.

Во фракции мононуклеаров, в отличие от фракции лейкоцитов, внесение LPS приводило к выраженной индукции выработки IL-1 β . β -эндорфин 10⁻⁷ М стимулировал как спонтанную, так и ЛПС-индуцированную продукцию IL-1 β мононуклеарами. Во фракции нейтрофилов к выраженной стимуляции уровня IL-1 β приводило только внесение ЛПС, β -эндорфин на спонтанную и ЛПС-индуцированную продукции данного цитокина статистически значимого влияния не оказывал, несмотря на имеющую место тенденцию к усилению. Во фракции моноцитов усиление продукции IL-1 β было зарегистрировано только в присутствии ЛПС, но не β -эндорфина.

Анализ продукции IL-1 β во фракции мононуклеаров в присутствии ФГА показал в отличие от фракции лейкоцитов усиление синтеза данного цитокина в присутствии лектина. В то же время, как и в нефракционированной клеточной взвеси, эффекта β -эндорфина на продукцию IL-1 β в присутствии ФГА зарегистрировано не было.

Продукция IL-8 во фракции мононуклеаров под воздействием ЛПС не изменялась, в то время как во фракции лейкоцитов она усиливалась. β -эндорфин угнетал продукцию IL-8 мононуклеарами в присутствии ЛПС. Во фракции нейтрофилов липополисахарид усиливал синтез IL-8, а β -эндорфин приводил к его угнетению. Во фракции моноцитов ЛПС, пептид и их комбинация на продукцию IL-8 не влияли. В присутствии ФГА во фракции мононуклеаров эффектов пептида на уровень IL-8 зафиксировано не было.

Таким образом, β -эндорфин оказывал иммуномодулирующий эффект в культуре клеток здоровых доноров, связанный со стимуляцией продукции IL-1 β и угнетением синтеза IL-8. Необходимо заметить, что все зарегистрированные эффекты β -эндорфина на IL-1 β проявлялись преимущественно в нефракционированных культурах (лейкоцитах и мононуклеарах), что указывает на необходимость кооперации различных клеточных популяций. Во фракциях нейтрофилов и моноцитов эффект β -эндорфина либо был выражен слабо, либо вообще отсутствовал.

РОЛЬ κ -ОПИОИДНЫХ РЕЦЕПТОРОВ В ПОСТСТРЕССОРНЫХ ИЗМЕНЕНИЯХ НЕКОТОРЫХ ПАРАМЕТРОВ ЛОКАЛЬНОГО ИММУННОГО ОТВЕТА

Гейн С.В., Сятчихин А.А.

Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН, г. Пермь

Пермский государственный университет, г. Пермь, Россия

Эндогенная опиоидная система играет важную роль в нейроэндокринной регуляции функций иммунной системы при остром стрессе. Принимая во внимание способность эндогенных опиоидных пептидов взаимо-

действовать с широким спектром опиатных рецепторов, в данной работе нами проводилась оценка участия к-опиатных рецепторов в стресс-индуцированных изменениях иммунитета в условиях локальной иммунизации эритроцитами барана.

Эксперимент проведен на беспородных белых мышках – самцах. В качестве экспериментальной модели стресса использовали ротационную модель. Животные были разбиты на 6 групп: контрольная и 5 опытных. Антагонист к-рецепторов биналторфимин (ног-BN1) в дозе 10, 1, 0,1 мг/кг вводили подкожно за 20 минут до ротации. Через 1 ч после экспериментального воздействия всех мышей иммунизировали эритроцитами барана под кожу правой стопы (модель локального иммунного ответа). На 5-е сутки эксперимента оценивали количество АОК, выраженность ГЗТ и пролиферацию клеток регионарного лимфатического узла.

Установлено, что у мышей, подвергнутых ротационному стрессу, наблюдалось статистически достоверная стимуляция выраженности ГЗТ, увеличение числа АОК и угнетение пролиферации в регионарном лимфатическом узле. Блокада к-опиатных рецепторов на фоне стресса отменяла увеличение числа АОК и угнетение пролиферации при использовании ног-BN1 в дозе 0,1 мг/кг. Более высокие дозы ног-BN1 эффекты ротационного стресса не модифицировали. Изолированное введение животным ног-BN1 не влияло на исследуемые показатели. Таким образом, показано участие к-опиатных рецепторов в регуляции иммунных реакций при стрессе в индуктивную фазу иммунного ответа.

ОБ УЧАСТИИ АУТОКРИННЫХ ФАКТОРОВ В ЗАЩИТЕ КЛЕТОК ЛИНИИ СТЛЛ-2 ОТ ОКИСЛИТЕЛЬНОГО СТРЕССА

Гречихина М.В., Дьячкова Л.Г., Луценко Г.В.

*Институт биоорганической химии
им. акад. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН,
Москва, Россия*

Введение. В многоклеточном организме выживание клеток находится под контролем множества цитокинов различной природы, в том числе и аутокринных факторов (АФ), продуцируемых клетками того же типа. Ранее нами было показано, что при окислительном стрессе клеток интерлейкин-2-зависимой линии СТЛЛ-2 дефицит АФ в культуре приводит к отягощению клеточного стресса и увеличению доли погибших клеток. Представляло интерес исследовать влияние повышенного содержания АФ в культуре на выживание клеток СТЛЛ-2 и их систему защиты в условиях окислительного стресса. Кроме широко известных механизмов защиты клеток от окислительного стресса с участием клеточных ферментов каталазы и глутатионпероксидазы в литературе описан еще один механизм, который состоит в секреции пирувата, субстрата цикла трикарбонных кислот, во внеклеточную среду. Пируват, вступая в реакцию с пероксидом водорода, одним из главных агентов окислительного стресса, удаляет его из среды.

Целью работы было выявление защитного действия АФ на клетки СТЛЛ-2 при окислительном стрессе, отличного от эффекта пирувата.

Материалы и методы. Культивирование клеток СТЛЛ-2 проводили в среде RPMI-1640 с добавлением 10% эмбриональной сыворотки, 2-меркаптоэтанола и интерлейкина-2. Выживание клеток оценивали с использованием МТТ-теста. Содержание пероксида водорода в среде оценивали спектрофотометрически по поглощению на длине волны 450 нм с использованием пероксидазы хрена и 3,3',5,5' tetramethylbenzidine (ТМВ) в качестве субстрата. Содержание пирувата также оценивали спектрофотометрически по поглощению на длине волны 340 нм (по уровню NADH в реакции превращения пирувата в лактат). Уровень АТФ в клетках измеряли с использованием биолюминесцентного люциферин-люциферазного метода. В качестве источника АФ использовали кондиционированную среду (КС) клеток линии СТЛЛ-2, получаемую из культур высокой плотности. Гель-фильтрацию КС проводили используя «Bio-gel P-10» в качестве носителя.

Основные результаты. Для исследования влияния АФ на выживание клеток СТЛЛ-2 в условиях окислительного стресса клетки культивировали в присутствии различных доз пероксида водорода с добавлением КС или свежей среды в качестве контроля. Добавление 50% КС к клеткам СТЛЛ-2 значительно повышало их выживание при высоких концентрациях пероксида водорода. Так, при концентрации 100 мкМ H_2O_2 выживание клеток с добавлением КС сохранялось на уровне 64%, в то время как в контроле оно снижалось до 15%. Определение концентрации H_2O_2 в культурах клеток СТЛЛ-2 в процессе окислительного стресса выявило существенные различия в содержании пероксида водорода в опытных и контрольных культурах. В контрольных культурах через 2 ч культивирования концентрация H_2O_2 составляла 8 мкМ, в то же время в культурах с добавлением 50% КС такое содержание H_2O_2 наблюдалось уже через 1 ч (при начальной концентрации H_2O_2 100 мкМ). Для оценки возможного участия пирувата в процессе удаления H_2O_2 из среды мы провели измерение содержания пирувата в КС клеток СТЛЛ-2. Оказалось, что пируват в КС присутствует в значительных количествах (144 ± 8 мкМ, $n = 11$), достаточных для быстрого удаления части H_2O_2 из среды. Для выявления защитного действия собственно АФ проводили очистку КС от пирувата с использованием гель-фильтрации. После гель-фильтрации пируват в КС не обнаруживался. Показано, что КС, очищенная от пирувата, обладает выраженным защитным действием, способствуя сохранению выживания клеток СТЛЛ-2 в присутствии 100 мкМ H_2O_2 на уровне 81%, достоверно превышающем контрольный уровень (33,5%, $p < 0,01$). Для выяснения механизма защитного действия АФ на клетки СТЛЛ-2 в условиях окислительного стресса была проведена проверка влияния АФ на уровень внутриклеточного АТФ в процессе стресса. Оказалось, что при добавлении АФ уровень АТФ в клетках в присутствии 100 мкМ H_2O_2 сохраняется на уровне в 1,5-2 раза более высоким, чем в контрольных клетках.

Заключение. Полученные результаты показывают, что АФ клеток СТЛЛ-2 способны защищать их от окислительного стресса, препятствуя быстрому снижению внутриклеточного содержания АТФ, что способствует сохранению их жизнеспособности.

ВЛИЯНИЕ ЛЕЙКОФИЛЬТРАЦИИ НА ИММУНОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ГЕМОКОМПОНЕНТОВ

**Данилова А.В., Чечёткин А.В., Лазаренко М.И.,
Коновенко С.Н., Кузьмин Н.С.**

*Российская Военно-медицинская академия,
Санкт-Петербург, Россия*

Лейкоциты гемокомпонентов, хранящихся при положительной температуре, выделяют цитокины, активированные компоненты комплемента, которые непосредственно участвуют в развитии негемолитических фебрильных реакций у реципиентов при гемотрансфузионной терапии.

Целью работы явилось исследование влияния лейкофильтрации на иммунологические свойства гемокомпонентов.

Были исследованы иммунологические показатели 42 образцов эритроцитной массы, полученной от доноров резерва и обедненной лейкоцитами с помощью лейкофильтров Leukotrap WB (Pall, Германия), Лейкосеп (Интероко, Россия), ВРF4 (Pall, Германия), Imugard III-RC (Terumo, Япония). Лейкофильтрацию осуществляли в течение первых суток с момента гемоэкфузии. С помощью унифицированных методов исследовали содержание интерлейкина-1 β (ИЛ-1 β), ИЛ-4, ИЛ-6, фактора некроза опухоли- α (ФНО α), компонентов комплемента С3, С3а, С5 в гемокомпонентах до фильтрации (в 1-3-е сутки после донации) и перед переливанием.

Установлено, что перед переливанием содержание ИЛ-1 β , ИЛ-6, ФНО α в лейкофильтрованных гемокомпонентах было значительно ниже по сравнению со стандартными эритроцитными гемокомпонентами тех же сроков хранения. При этом наименьшая концентрация ИЛ-1 β , ФНО α , ИЛ-6 выявлена в эритроцитных гемокомпонентах, полученных с помощью лейкофильтра Leukotrap WB и ВРF4. Содержание ИЛ-4 было ниже в эритроцитной массе, фильтрованной с помощью устройства ВРF4. В более высокую сторону отмечено содержание ИЛ-1 β и ИЛ-4 в эритроцитной массе, полученной с помощью лейкофильтра Лейкосеп. Выявлено, что лейкофильтрация не активировала компоненты комплемента. Более того, содержание компонента комплемента С5 было ниже в лейкофильтрованной с помощью фильтра ВРF4 эритроцитной массе по сравнению со нефильтрованными гемокомпонентами.

При исследовании зависимости между сроками предфильтрационного хранения среды и ее иммунологическими свойствами установлено, что по мере хранения эритроцитной массы в течение 72 ч содержание С5 и С3 в ней существенно не изменялось. В те же сроки концентрация С3а в компонентах увеличилась на 27%. Подобные результаты были получены при анализе содержания цитокинов в трансфузионных средах в зависимости от сроков предфильтрационного хранения. По мере хранения эритроцитов до фильтрации содержание ИЛ-1 β , ФНО α , ИЛ-6 постепенно увеличивалось. Содержание ИЛ-4 в течение сроков хранения почти не изменялось.

Таким образом, лейкофильтрация сопровождается изменением иммунологических свойств гемокомпонен-

тов, степень выраженности которых зависит от сроков предфильтрационного хранения трансфузионной среды и конструктивных особенностей лейкофильтров.

ИССЛЕДОВАНИЕ ОБРАЗЦОВ ЧЕЛОВЕЧЕСКОГО СЫВОРОТОЧНОГО γ -ГЛОБУЛИНА, СВЯЗАВШЕГО КАТИОНЫ МЕДИ И ЦИНКА В РАЗЛИЧНЫХ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ УСЛОВИЯХ

Денисова Е.А., Монгуш Э.М., Чекнев С.Б.

*НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф. Гамалеи
РАМН, Москва, Россия*

Введение. Ранее установлено, что конформационные преобразования γ -глобулина, вызываемые встраиванием в структуру молекулы катионов металлов, изменяют представленность на поверхности глобулы антигенных детерминант белка и их доступность для распознавания специфическими антителами. Эти данные получены нами в условиях нагрузки γ -глобулина значительным молярным избытком металла и в условиях эквимольного связывания катионов.

Целью исследования явилась конформационная и иммунохимическая характеристика образцов человеческого сывороточного γ -глобулина, модифицированного присоединением катионов меди и цинка в незначительном молярном избытке по отношению к белку.

Методика исследования предполагала связывание γ -глобулином (ICN) меди и цинка из раствора с различной концентрацией катионов; удаление свободного металла молекулярной ультрафильтрацией в ячейках Ultracel-30k (Millipore); определение содержания не связавшихся с белком меди и цинка; расчет количества присоединенных к белку катионов; восстановление образцов γ -глобулина в исходном объеме раствора. Конформационное состояние белка оценивали спектрофотометрически в ультрафиолете с использованием дифференцирующего спектрофотометра PU 8730 UV/VIS (Philips). Иммунохимическую характеристику образцов осуществляли в реакциях радиальной иммунодиффузии по Оухтерлони и Манчини с козьими антителами против IgG (H+L) человека (Медгамал), а также в прямом и «сэндвич» вариантах иммуноферментного анализа (ИФА) с мечеными пероксидазой кроличьими анти-IgG (H+L) человека антителами (Медгамал). ИФА проводили с использованием ELISA Processor II (Behring).

Результаты работы показывают, что при концентрациях металла в растворе 0,5 и 2,5 мкг/мл интенсивность связывания γ -глобулином меди практически не различается, тогда как присоединение к белку катионов цинка обратно коррелирует с содержанием последних. Связывание металла не вызывает заметных сдвигов длинноволновой полосы поглощения γ -глобулина; в коротких длинах волн у белка с медью определяется выраженная гипохромия. Радиальная иммунодиффузия проявляет закрытие в образцах, модифицированных медью, части специфических антигенных детерминант γ -глобулина (реакция Оухтерлони) и экспрессию дополнительных, стабилизируемых металлом, детерминант в опытах с цинком (реакция Манчини). Результаты подтверждаются в прямом ва-

рианте ИФА. Постановка «сэндвич» варианта ИФА обнаруживает общие закономерности и особенности экспрессии антигенных детерминант белками, связанными медь и цинк. При этом спектр доступных для распознавания антигенных детерминант существенно зависит от конформационного состояния белка в исходном растворе с металлом.

Заключение. Присоединяемые в незначительном молярном избытке по отношению к белку катионы меди и цинка заполняют специфические сайты связывания металла в молекуле γ -глобулина.

ВЛИЯНИЕ НЕЙТРОФИЛОВ И ПРОДУКТОВ ИХ СЕКРЕЦИИ НА ФАКТОРЫ, УЧАСТВУЮЩИЕ В ФОРМИРОВАНИИ КОЛОНИЗАЦИОННОЙ РЕЗИСТЕНТНОСТИ

Долгушин И.И., Андреева Ю.С., Свиридов М.А., Савочкина А.Ю., Мезенцева Е.А., Плеханова Е.В., Скороходов А.Н., Чванов В.В., Телешева Л.Ф., Марачев С.И., Матвеева Д.Н., Тупиков В.А.

НИИ иммунологии ГОУ ВПО «Челябинская государственная медицинская академия Федерального агентства по здравоохранению и социальному развитию», г. Челябинск, Россия

Колонизационная резистентность половой сферы женщины обусловлена ее анатомическими и физиологическими особенностями, наличием нормальной микрофлоры, гуморальных и клеточных факторов иммунитета. Нижний отдел половых путей женщины представляет собой экологическую нишу, включающую в себя плоский эпителий внутренней поверхности стенки влагалища, цилиндрический эпителий шейки матки и вагинальный секрет, которые характеризуются определенными морфофизиологическими и биохимическими особенностями, в связи с чем каждый из этих биотопов заселен специфической популяцией микроорганизмов. В то же время в цервикальном и вагинальном секретах всегда присутствует значительное количество нейтрофилов, которые, покидая ткани, мигрируют

на поверхность слизистых оболочек, где и разрушаются, в результате чего выделяют наружу свои продукты, которые, возможно, влияют на факторы, участвующие в формировании устойчивости организма к инфекционным агентам. В этой связи возникло предположение, что одной из функций цервикальных и вагинальных нейтрофилов является участие в формировании колонизационной резистентности. Данное предположение и определило **цель исследования** – изучить влияние нейтрофилов и их секреторных продуктов на процесс адгезии грибов рода *Candida* на поверхности вагинального эпителия и определить роль нейтрофильных гранулоцитов в формировании микробиоценоза влагалища здоровых женщин и женщин с бактериальным вагинозом. Проведенные нами исследования показали, что у здоровых женщин содержание лактобактерий в пробе под действием нейтрофилов и их секреторных продуктов существенно не менялось. Нейтрофилы значимо снижали лишь содержание коагулазонегативных стафилококков в вагинальной слизи. На дрожжеподобные грибы и *E. coli* все тестируемые образцы оказывали бактерицидное действие. У женщин с бактериальным вагинозом было отмечено снижение содержания в секрете количества стафилококков под действием секреторных продуктов нейтрофилов. Инкубация с вагинальным секретом очищенной фракции нейтрофилов не оказывала значимого влияния на содержание стафилококков. Нейтрофилы (НФ), супернатант неактивированных (СНН) и активированных (САН) нейтрофилов значимо снижали содержание гарднерелл в вагинальной слизи. При изучении влияния продуктов нейтрофилов на лактофлору было обнаружено незначительное бактерицидное действие супернатантов на эти бактерии. Вместе с тем было установлено, что добавление цельной крови к вагинальному содержимому женщин с бактериальным вагинозом стимулирует рост лактобактерий. Продолжая исследование, мы решили оценить показатели адгезии грибов рода *Candida* на поверхности вагинального эпителия. Опыты проводили по методике, предложенной Махровой Т.В. В 2004 г. Результаты оценивали по трем показателям: 1. Активность адгезии (АА) – количество

ТАБЛИЦА. ВЛИЯНИЕ СУПЕРНАТАНТОВ НЕАКТИВИРОВАННЫХ И АКТИВИРОВАННЫХ НЕЙТРОФИЛОВ НА АДГЕЗИВНУЮ СПОСОБНОСТЬ *CANDIDA ALBICANS* НА ВАГИНАЛЬНЫХ ЭПИТЕЛИОЦИТАХ

(к работе Долгушина И.И., Андреевой Ю.С. и соавт.)

| Группа | Показатель | Стат. показатель | Контроль | СНН | САНВ |
|--|--------------|------------------|-------------|-------------|------------------|
| | | n | 31 | 24 | 7 |
| Влияние секреторных продуктов нейтрофилов на вагинальные эпителиоциты здоровых женщин | АА, % | (M±m) | 61,26±1,84 | 58,43±3,05 | 65,43±2,67 |
| | ИА, усл. ед. | (M±m) | 129,84±6,36 | 125,48±8,84 | 170,14±16,73* ** |
| | АЧ, усл. ед. | (M±m) | 2,09±0,06 | 2,12±0,10 | 2,58±0,20* |
| Влияние секреторных продуктов нейтрофилов на клетки контрольных штаммов грибов рода <i>Candida</i> | АА, % | (M±m) | 61,26±1,84 | 49,13±3,09* | 67,14±2,09** |
| | ИА, усл. ед. | (M±m) | 129,84±6,36 | 95,57±8,26* | 205,00±23,04* ** |
| | АЧ, усл. ед. | (M±m) | 2,09±0,06 | 1,89±0,07* | 3,04±0,30* ** |

Примечания. АА – активность адгезии; ИА – интенсивность адгезии; АЧ – адгезивное число; СНН – секреторные продукты неактивированных нейтрофилов; САНВ – секреторные продукты нейтрофилов, активированных бифидобактериями; * – достоверность отличий по сравнению с показателями спонтанной адгезии (контроль) ($p < 0,05$); ** – достоверность отличий по сравнению с показателями адгезии после действия СНН ($p < 0,05$).

вагинальных эпителиоцитов с адгезированными кандидами на 100 посчитанных эпителиоцитов. 2. Интенсивность адгезии (ИА) – количество кандид, адгезированных на 100 вагинальных эпителиоцитах. 3. Адгезивное число (АЧ) – количество адгезированных кандид на одной эпителиальной клетке. В результате проведенных исследований установили, что при предварительной обработке кандид супернатантом неактивированных нейтрофилов происходило достоверное снижение активности, интенсивности адгезии и адгезивного числа, в то время как, действие секреторных продуктов на эпителиальные клетки не оказывало значимого влияния на адгезивные характеристики. При действии на кандиды и эпителиоциты супернатанта нейтрофилов, активированных бифидобактериями, все показатели адгезии достоверно повышались (табл.). Таким образом, неактивированные нейтрофилы и их секреторные продукты оказывают регулирующее и нормализующее влияние на состав флоры слизистых оболочек, оказывая бактерицидный эффект на условно-патогенные микроорганизмы и снижая колонизацию эпителия грибами рода *Candida*, тем самым, участвуя в селективной деконтаминации влажной биотопы. Однако, активация нейтрофила бифидобактериями приводит к изменению регулирующего эффекта его секреторных продуктов и повышению показателей адгезии дрожжеподобных грибов на поверхности вагинального эпителия, что необходимо учитывать при назначении пробиотиков с целью коррекции нормофлоры.

ВЛИЯНИЕ КОМПОНЕНТОВ СЫВОРОТКИ КРОВИ НА АДГЕЗИВНЫЕ СВОЙСТВА *CANDIDA ALBICANS*

Долгушин И.И., Свиридов М.А.

НИИ иммунологии ГОУ ВПО «Челябинская государственная медицинская академия Федерального агентства по здравоохранению и социальному развитию», г. Челябинск, Россия

Частота кандидозного вульвовагинита за последние десять лет почти удвоилась и составляет 30–40% в структуре инфекционных поражений вульвы и влагалища, при этом основным патогеном является *Candida albicans* (75–90% случаев). Однако до настоящего времени остаются не до конца изученными механизмы взаимодействия кандид с вагинальными эпителиоцитами. Любой инфекционный процесс в слизистых оболочках не зависимо

от этиологии развивается по одному и тому же сценарию. Наиболее ранним этапом взаимодействия клеток микроорганизма (грибы) и макроорганизма является адгезия возбудителя к поверхности эпителия, которая лежит в основе развития носительства, а в ряде случаев – при снижении иммунобиологических защитных сил организма – инвазивного микотического процесса. Нами было выдвинуто предположение о возможном воздействии на адгезию грибов рода *Candida* на эпителии влажной биотопы компонентов сыворотки крови здоровых доноров, которая, вероятно, способна препятствовать адгезии микроорганизмов на вагинальном эпителии. В связи с этим мы исследовали влияние цельной сыворотки крови и сыворотки крови, истощенной микробной взвесью *C. albicans* на адгезию грибов *C. albicans* на поверхности вагинальных эпителиоцитов. Целью настоящего исследования являлась оценка адгезивной активности грибов *Candida albicans* на поверхности вагинальных эпителиоцитов под воздействием сыворотки крови здоровых доноров. Обследованы 14 здоровых женщин репродуктивного возраста 18–30 лет в первой фазе менструального цикла. Влияние сыворотки крови на *Candida albicans* и вагинальные эпителиоциты изучали путем смешивания осадка суточной культуры *Candida albicans* (10^7 клеток) или взвеси вагинальных эпителиоцитов (10^6 клеток/мл) с смесью сыворотки крови от 5–7 доноров. Смесь инкубировали 30 минут при температуре 37°C . В контроле вместо сыворотки крови использовали забуференный физиологический раствор (ЗФР). После отмывания десятикратным объемом ЗФР кандиды доводили до концентрации 10^7 клеток/мл, а эпителий до 10^6 клеток/мл и использовали для изучения адгезивных реакций с вагинальными клетками и кандидами соответственно. Для определения вклада антител, содержащихся в сыворотке крови, в общий антиадгезивный эффект, сыворотку крови истощали микробной взвесью (*C. albicans*) в течение 30 минут при температуре 37°C . Обработку истощенной сывороткой крови проводили аналогично с воздействием цельной сыворотки крови. Для определения адгезивной активности брали 0,5 мл взвеси *C. albicans* (10^7 клеток/мл) и вносили в пробирку с 0,5 мл взвеси вагинальных эпителиоцитов (10^6 клеток/мл). Проводили 3 опыта: 1. *C. albicans*, обработанные цельной или истощенной сывороткой крови + интактные эпителиоциты. 2. Эпителиоциты, обработанные цельной или истощенной сывороткой крови + интактные *C. albicans*. 3. Интактные эпителиоциты + интактные *C. albicans* для контроля. Каждую из перечисленных выше смесей инку-

ТАБЛИЦА. ВЛИЯНИЕ СЫВОРОТКИ КРОВИ НА АДГЕЗИВНУЮ СПОСОБНОСТЬ *CANDIDA ALBICANS* К ВАГИНАЛЬНЫМ ЭПИТЕЛИОЦИТАМ (к работе Долгушина И.И. и Свиридова М.А.)

| Группа n = 14 | Показатель | Стат. показ | Контроль | Сыворотка | Истощенная сыворотка |
|---------------------|--------------|-------------|--------------|--------------|----------------------|
| Влияние на эпителий | АА, % | (M±m) | 71,54±2,90 | 65,21±3,26 | 71,07±3,13 |
| | ИА, усл. ед. | (M±m) | 173,46±10,99 | 117,86±7,52* | 177,64±17,82 |
| | АЧ, усл. ед. | (M±m) | 2,42±0,11 | 1,80±0,08* | 2,42±0,16 |
| Влияние на кандиды | АА, % | (M±m) | 71,54±2,90 | 51,14±3,71* | 49,14±3,45* |
| | ИА, усл. ед. | (M±m) | 173,46±10,99 | 93,79±11,10* | 85,79±8,67* |
| | АЧ, усл. ед. | (M±m) | 2,42±0,11 | 1,77±0,10* | 1,73±0,10* |

Примечания. АА – активность адгезии; ИА – интенсивность адгезии; АЧ – адгезивное число; * – достоверность отличий по сравнению с показателями спонтанной адгезии (контроль) ($p < 0,05$); ** – достоверность отличий по сравнению с показателями адгезии после действия СНН ($p < 0,05$).

бировавали в течение 30 минут при температуре 37°C в растворе Хенкса. Эпителиоциты отмывали от неприкрепившихся кандид ЗФР, из осадка клеток готовили мазки, окрашивали кристаллическим фиолетовым. Адгезию оценивали по трем показателям: 1. Активность адгезии (АА) – количество вагинальных эпителиоцитов с адгезированными кандидами из 100 посчитанных эпителиоцитов. 2. Интенсивность адгезии (ИА) – количество кандид, адгезированных на 100 вагинальных эпителиоцитах. 3. Адгезивное число (АЧ) – количество адгезированных кандид на одной эпителиальной клетке. Проведенные нами эксперименты показали, что при обработке кандид цельной сывороткой крови происходило ослабление адгезии *C. albicans* на вагинальных клетках ($p < 0,05$). Наблюдалось снижение всех показателей адгезии – АА, ИА и АЧ. Данное свойство сыворотки крови могло быть обусловлено различными факторами. В частности, антиадгезивной активностью могли обладать антитела, содержащиеся в сыворотке крови. Для определения вклада антител в общий антиадгезивный эффект, сыворотку крови истощали микробной взвесью *C. albicans*. После обработки кандид истощенной сывороткой крови при 37°C получили такой же эффект, как и при обработке их цельной сывороткой крови. При предварительном воздействии на эпителиоциты цельной сыворотки происходило снижение ИА и АЧ, а при влиянии истощенной сывороткой адгезивные характеристики *C. albicans* не изменялись.

Антитела сыворотки здоровых женщин экранируют сайты адгезии *C. albicans* на эпителиоцитах, но не влияют на сами *C. albicans*. Сыворотка здоровых женщин тормозит адгезию *C. albicans* на эпителии за счет блокады факторов адгезии на *C. albicans* доимунными механизмами.

ВЛИЯНИЕ НЕЙТРОФИЛОКИНОВ НА СУБПОПУЛЯЦИОННЫЙ СОСТАВ МАКРОФАГОВ В ПРОЦЕССЕ ФОРМИРОВАНИЯ ПРОТИВОЧУМНОГО ИММУНИТЕТА

Дорошенко Е.П., Киселёва А.К., Иванова И.А., Беспалова И.А., Васильева Г.И.

ФГУЗ научно-исследовательский противочумный институт, г. Ростов-на-Дону, Россия

В последние годы внимание исследователей привлекает иммунофагоцитарная система, комплексное представление о которой сформировалось в начале 90-х годов прошлого века и позволило рассматривать эту систему не только как центральное звено неспецифической защиты от инфекционных заболеваний, но и как иммунорегуляторную систему, направленную на стабилизацию внутренней среды организма [Исачкова Л.М., Плехова Н.Г., 1997]. Особый интерес представляет проблема функционального взаимодействия моно- и полинуклеарных фагоцитов, которые, обладая мощным микробцидным цитотоксическим потенциалом, высокой реактивностью и мобилизационной готовностью, участвуют в первичных эффекторных реакциях иммунологического гомеостаза [Coulau T.W., 1997]. Существование цитокинопосредованных связей между моно- и полинуклеарными фагоцитами в настоящее время не вызывает сомнений. Эти клетки являются продуцентами и мишенями цито-

кинов, участвующих в паракринной внутрисистемной регуляции, обеспечивающей функционирование единого «фагоцитарного клеточного домена». В связи с этим понятен интерес исследователей к цитокинопосредованной регуляции кооперативного взаимодействия моно- и полинуклеарных фагоцитов в процессе формирования противoinфекционного иммунитета, в частности, влиянию нейтрофилокинов (НК) – цитокинов, синтезируемых нейтрофилами (Нф), на функциональную активность клеток системы мононуклеарных фагоцитов (СМФ). Современное представление о роли СМФ основывается на ее функциональной гетерогенности [Манько В.М., Хаитов Р.Н., 1985; Bursucker I., Goldman A., 1983]. Известно, что клетки СМФ отличаются в зависимости от вида и линии животного, тканевой локализации в пределах одного организма, а также внутри одной и той же ткани [Walker W.S., Hester F.B., 1987]. Выделены отдельные субпопуляции перитонеальных, альвеолярных и селезеночных макрофагов (Мф), различающиеся по морфологическим и биохимическим свойствам, а также по функциональной активности и своей «специализации» в процессе поддержания гомеостаза организма [Земсков В.М., 1985; 1986]. Доказана различная способность отдельных субпопуляций перитонеальных и селезеночных Мф к модуляции иммунного ответа [Tzevalou E., 1987].

Цель настоящего исследования: изучение влияния нейтрофилокинов на распределение субпопуляций перитонеальных Мф при первичном и вторичном иммунном ответе на *Yersinia pestis EV*.

Исследования выполняли на перитонеальных Мф и НФ беспородных мышей. В качестве индуктора синтеза НК использовали м.к. *Y. pestis EV*. Супернатанты, содержащие НК, получали центрифугированием культур клеток при 1000 g в течение 10 мин с последующим фильтрованием через мембранные фильтры с диаметром пор 0,22 мкм. Для оценки способности НК вызывать перераспределение субпопуляций перитонеальных Мф за 4 ч до эксперимента подопытным животным вводили внутривентриально 0,1-0,2 мл НК, контрольным – 0,15 М раствор хлорида натрия в том же количестве. Клетки перитонеального экссудата вымывали средой 199. Разделение Мф перитонеального экссудата на субпопуляции осуществляли методом адгезии в градиенте температур [Васильева Г.И., 1990]. Индекс перераспределения субпопуляций (ИПС) определяли по формуле: $ИПС = C_D : C_A$, где C_D и C_A – относительное содержание в суммарном пуле субпопуляций, выделенных при 37°C и 2°C соответственно.

Проведенные исследования выявили существенное увеличение (в 24 раза) ИПС при введении интактным животным НК, синтезируемых «иммунными» Нф при стимуляции их м.к. *Y. pestis EV*. Такой высокий показатель ИПС, по нашим данным, наблюдается в результате формирования противочумного иммунитета под воздействием высокоиммуногенных препаратов. Следует отметить, что перераспределение субпопуляций Мф идет в сторону количественного увеличения субпопуляции Д на фоне неизмененного относительного содержания клеток других субпопуляций. Биологический смысл указанного явления заключается, по-видимому, в том, что с помощью НК организм пытается удержать в очаге воспаления клетки субпопуляции Д, наиболее активной при формировании противочумного иммунитета.

Таким образом, наблюдаемое в иммунном организме перераспределение субпопуляций перитонеальных Мф, по-видимому, обусловлено НК, синтез которых индуцирован вакцинирующими препаратами.

РОЛЬ МИКРООКРУЖЕНИЯ В ОБРАЗОВАНИИ ИММУНОГЛОБУЛИНОВ В-ЛИМФОЦИТАМИ МЫШИ

Дьяков И., Григорьев И., Сидорова Е.

НИИ вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова РАМН, Москва, Россия

Введение. Известно, что субпопуляции В-клеток в организме мышей распределены неодинаково. Основную массу В-лимфоцитов селезенки составляют В-2, а перитонеальной полости – В-1 клетки. Функциональная активность В-клеток селезенки и брюшной полости также неодинакова. В то время как В-клетки селезенки синтезируют и секретируют иммуноглобулины (ИГ), выявить ИГ-образующие клетки (ИГОК) в брюшной полости не удается.

Цели и задачи исследования. Целью работы являлось установление различий в функциональной активности В-лимфоцитов селезенки и брюшной полости и выяснение их причины. Для этого исследовали: 1) приобретают ли введенные в селезенку перитонеальные В-клетки мыши способность к секреции ИГ и 2) сохраняют ли способность к образованию ИГ клетки селезенки, введенные в брюшную полость.

Материалы и методы. В качестве модели использовали адаптивный перенос клеток между конгенными линиями мышей СВА (нормальные) и СВА/Н (xid-мыши, дефектные по гену *Vtk* и лишённые $CD5^+B-1$ клеток). Функциональную активность переносимых лимфоцитов оценивали по числу IgM-ИГОК и IgM-антителообразующих клеток (АОК), выявляемых с помощью клеточного иммуноферментного анализа. В качестве модельного антигена использовали Т-независимый антиген 2-го типа – поливинилпирролидон с молекулярной массой 350 kDa (ПВП), на который отвечают в основном $CD5^+B-1$ клетки.

Результаты исследования и обсуждение. У интактных мышей СВА в селезенке было обнаружено в среднем 258 ± 21 АОК и 3338 ± 626 ИГОК на млн клеток. У интактных xid-мышей эти показатели были значительно ниже: 48 ± 19 АОК и 523 ± 149 ИГОК на млн клеток. Внутривенный перенос 15 млн спленоцитов СВА мышам СВА/Н приводил к частичному «восстановлению» содержания АОК (154 ± 48 /млн) и ИГОК (1565 ± 393 /млн). Наблюдаемое увеличение может быть объяснено «вкладом» перенесенных СВА В спленоцитов (переносимых клетки содержали около 150 АОК/млн и 3500 ИГОК/млн).

Внутривенный перенос 2,5 млн перитонеальных клеток СВА, исходно не содержащих ИГОК, приводил к такому же увеличению числа АОК и ИГОК в селезенке СВА/Н реципиентов, что и перенос 15 млн спленоцитов. Увеличение числа ИГОК выявлялось на 2-3 сутки, достигало максимума на 4-е сутки, и поддерживалось на этом уровне в течение 4-х недель (время наблюдения). Таким образом, перитонеальные клетки СВА мышей не только приобретали в xid-селезенке способность к секреции ИГ, но и оказывались в этом

отношении в 6 раз эффективнее селезеночных. Полученные данные свидетельствуют о том, что ведущую роль в функциональной активности В-клеток играют факторы микроокружения.

В следующей серии опытов xid-мышей спустя сут или неделю после переноса им клеток селезенки или брюшной полости иммунизировали ПВП (2 мкг внутривенно) В качестве контроля использовали иммунизированных мышей СВА. Ответ определяли на 4-е сут после иммунизации. У контрольных СВА животных введение ПВП приводило к выраженному иммунному ответу. Количества АОК и ИГОК на млн клеток селезенки возрастали у них по сравнению с таковыми у неиммунизированных мышей более чем в 2,5 раза. У xid-мышей как интактных, так и получавших СВА спленоциты, иммунизация или вообще не индуцировала иммунного ответа, или вызывала незначительное (не более 20%) увеличение числа АОК и ИГОК. Это указывает на то, что полного восстановления иммунореактивности xid-мышей не происходит. Возможно, дело в сроках введения антигена или в дефектах микроокружения.

Заключение. Полученные данные свидетельствуют о решающей роли микроокружения в функциональной активности В-клеток. Предполагается наличие в брюшной полости мышей факторов, угнетающих синтез/секрецию IgM В-клетками.

СТРАТЕГИЯ ОТВЕТНЫХ РЕАКЦИЙ ЦЕЛОМОЦИТОВ МОРСКОЙ ЗВЕЗДЫ *ASTERIAS RUBENS* ПРИ АЛЛОГЕННОМ ВЗАИМОДЕЙСТВИИ В УСЛОВИЯХ *IN VITRO*

Дьячков И.С., Кудрявцев И.В., Сухачев А.Н., Полевщиков А.В.

НИИ экспериментальной медицины РАМН, Санкт-Петербург, Россия

Ввиду того, что иглокожие наряду с позвоночными относятся к стволу вторичноротых животных, изучение защитных реакций морских звезд может вести непосредственно к истокам развития иммунной системы позвоночных. Беспозвоночные полностью лишены механизмов приобретенного иммунитета, однако, несмотря на более низкую организацию и простое строение у них наблюдаются реакции, эквивалентные клеточным ответам позвоночных. Наиболее распространенной и «естественной» среди них является цитотоксический ответ, лежащий в основе отторжения аллогенных тканей. Уникальность этого метода и его значение состоят в том, что он позволяет количественно оценить цитотоксичность как отдельных клеток, так и их агрегатов при сохранении жизнеспособности клеток и возможности динамического наблюдения за ходом реакции. Факт распознавания чужеродного материала клетками беспозвоночных является пусковым механизмом для развития одной из универсальных стратегий защиты – формирования плотной клеточной изоляции инородной частицы, наряду с такими процессами, как агрегация и коагуляция. Морфологическая картина аллогенного взаимодействия была описана в динамике на модели развития капсулы в условиях смешанной культуры в условиях *in vitro* при равных соотношениях клеток-эф-

факторов и мишеней 1:1. По окончании времени инкубации 3, 9 и 18 ч производили фотографирование лунок с определением ОП надосадков на 530 нм. Для визуализации динамики комплексообразования клетки-мишени были окрашены нетоксичным нейтральным красным, накопление которого в цитоплазме не снимало жизнеспособности мишеней. Для устранения процесса спонтанного свертывания аутологических форменных элементов сыворотки иглокожих смешанная культура была поставлена в дефицитных по Ca^{2+} и Mg^{2+} условиях. Предположительно процесс капсулообразования представляется каскадом взаимосвязанных процессов, первым из которых являются конфронтационные отношения лимфоцитоподобных клеток с чужеродными клетками. Подобные взаимодействия предшествуют последующей миграцией сюда гранулярных амебозитов, дегрануляция которых привлекает субпопуляции плазматозитов с образованием так называемой клеточной сети, обеспечивающей окончательное формирование капсулы. Показано, что эффект прямой цитотоксичности в виде выраженного гемолиза ЭЧ опосредован гемолитическими факторами, синтезированными агрегатами клеток, образовавшихся в ходе межклеточной кооперации. Причем нами установлено, что фракции целоцитов различаются по цитотоксической активности, минимальная цитотоксическая активность была связана с фракцией, содержащей в основном лимфоцитоподобные клетки. Сходную активность проявляли клетки фракции, содержащей, в основном, агранулярные целоциты, так и лимфоцитоподобные клетки. Максимальная цитотоксичность в отношении ЭЧ обеспечивали клетки фракции (в основном гранулярные амебозиты). Это, а также ранее полученные данные о повышении цитотоксичности клеток (по числу зон гемолиза) под влиянием рекомбинантных IL-1 α (во фракцияагранулярных лимфоцитоподобных клеток на 65% и 28,25% соответственно), и С3а (в гранулярной фракции клеток на 56%) и отсутствии выраженного лизиса аллогенных клеток при капсулообразовании свидетельствуют, что первичная задача защитной системы при аллогенном взаимодействии сводится к инактивации (блокаде) – создания барьера с последующим разрушением и выведением чужеродного из циркуляции. Учитывая, что в процессе формирования капсулы, по видимому, задействованы все субпопуляции циркулирующих клеток, передавая приоритет участия друг другу по эстафете, можно предположить, что при аллогенном взаимодействии участие цитокиноподобных молекул сводится лишь к регуляции межклеточной кооперации, но не влияет на их цитотоксическую активность, подтверждая наряду с фактом пролиферации целоцитов иглокожих в ответ на антилимфоцитарные IgG-антитела справедливость одной из гипотез о становлении распознающих молекул иммуноглобулинового суперсемейства на основе адгезионных молекул. Более того, на сроке 24 ч в аллогенных культурах содержание TNF α в 1,48 раза, а IFN γ в 2,28 раза было выше, чем в контролях. Это, а также обнаружение TNF α во всех культурах за исключением аутологичной позволяет предполагать наличие регуляторных влияний TNF α - и IFN γ -подобных молекул при аллогенном распознавании.

Работа поддержана грантами РФФИ № 07-04-00084 и 07-04-00095.

ВЛИЯНИЕ ПРОТИВТУБЕРКУЛЕЗНЫХ ПРЕПАРАТОВ НА АКТИВНОСТЬ ФАГОЦИТОЗА МАКРОФАГОВ МЫШЕЙ

Заболотных Н.В., Виноградова Т.И., Витовская М.Л.
ФГУ «СПбНИИФ Росздрава», Санкт-Петербург, Россия

Стремительное распространение туберкулеза с множественной лекарственной устойчивостью (МЛУ), плохо поддающегося терапии и протекающего с выраженной ингибцией иммунной системы, обуславливает всплеск интереса к проблеме воздействия противотуберкулезных препаратов (ПТП) на функциональное состояние иммунокомпетентных клеток. Особенно актуален вопрос о направленности результирующего эффекта этиотропной терапии, поскольку лечение больных туберкулезом с множественной лекарственной устойчивостью требует длительных (более 6 месяцев) курсов 4-5 компонентных композиций ПТП.

Целью исследования явилась оценка влияния основных схем лечения лекарственно-чувствительного и туберкулеза с МЛУ на активность фагоцитоза перитонеальных макрофагов (пМф) мышей. Результаты исследования показали, что через месяц от начала этиотропной терапии генерализованного туберкулеза у мышей на фоне постепенного снижения тяжести течения специфического процесса и частичного восстановления активности фагоцитарных реакций, ингибированных у зараженных нелеченных животных, развивается повторное угнетение поглотительной и переваривающей функции пМф (по фагоцитозу *Sacch. cerevisiae*). Оно зафиксировано при монотерапии на фоне изониазида, рифампицина и рифабутина, но не отмечено под влиянием этамбутола, амикацина, офлоксацина и нового ПТП «перхлорона». Полихимиотерапия ПТП обладала эффектом подавления фагоцитарной функции Мф при лечении лекарственно-чувствительного туберкулеза комбинациями изониазид + рифампицин, изониазид + рифампицин + пиразинамид, а при лекарственно-устойчивой инфекции – изониазид + амикацин + этамбутол + офлоксацин; рифабутин + амикацин + этамбутол + офлоксацин; рифабутин + изониазид + амикацин + этамбутол + офлоксацин. Степень ингибции пМф была наибольшей при терапии туберкулеза с МЛУ одной из оптимальных композиций – изониазид + амикацин + этамбутол + офлоксацин, однако существенно снижалась присоединением перхлорона. На интактных мышках подавление фагоцитоза Мф зарегистрировано через 23, 28 и 58 дней введения ПТП, как в виде монотерапии, так и в 4-5 компонентных композициях. При этом использование схемы изониазид + амикацин + этамбутол + офлоксацин так же, как и у зараженных животных, вызывало наиболее сильное подавление поглотительной и переваривающей функции пМф.

Таким образом, различные, в том числе высокоэффективные при лечении туберкулеза с множественной лекарственной устойчивостью, комбинации ПТП отличаются по степени ингибции функциональной активности макрофагов. Это следует учитывать при выборе схем этиотропной терапии, поскольку макрофаги во многом определяют течение воспалительной реакции и процессов репарации тканей. Адекватная коррекция иммунотоксического действия ПТП способна повысить эффективность лечения инфекции и предотвратить блокирование переваривания микобактерий как способа их внутриклеточного выживания.

ПОЛИАДГЕЗИНЫ: АНТИИММУННОЕ ОРУЖИЕ БАКТЕРИАЛЬНЫХ ПАТОГЕНОВ

Завьялов В.П.¹, Завьялов А.В.², Завьялова Н.А.¹,
Корпела Т.¹

¹ Объединенная Лаборатория биотехнологии,
Департамент химии, Университет Турку,
Турку, Финляндия

² Департамент молекулярной биологии, Шведский
Университет сельскохозяйственных наук,
Уппсала, Швеция

Прикрепление бактериальных патогенов к клеткам организма-хозяина является ключевым этапом развития инфекции. Прикрепление необходимо для колонизации тканей организма и опосредуется адгезинами поверхности. Адгезины ответственны за связывание со специфическими рецепторами клеток организма. Сборка адгезинов доминантного класса происходит посредством секреторной системы консервативных белков-шаперонов/проводников. Суперсемейство адгезивных фимбрий, связанное периплазматическим комплексом шаперонов/проводников, состоит из двух особых классов органелл. Один из этих классов органелл образует адгезивные ворсинки с субъединицей сложного состава (пилин), и только одни специализированный адгезивный домен на конце ворсинки. Сборка адгезивных ворсинок происходит при помощи периплазматических шаперонов класса FGS (с короткой петлей F1-G1). Другой класс органелл образует поливалентные адгезивные фимбрии только с одним-двумя типами субъединиц. Их особенность состоит в том, что все их субъединицы обладают адгезивной активностью, как полиадгезины [1]. Сборка полиадгезинов происходит с помощью периплазматических шаперонов класса FGL (с длинной петлей F1-G1). Эти волокна, имеющие сайт связывания на каждой из субъединиц, могут обеспечивать поливалентное закрепление бактерий на клетках организма-хозяина, агрегируя их рецепторы и запуская «подрывные» сигналы, позволяющие патогенам уклоняться от иммунной защиты [1]. Полиадгезины широко представлены у Грамотрицательных патогенов. Бактерии, экспрессирующие их, могут вызывать смертельные системные заболевания, как, например, бубонную и легочную чуму (*Yersinia pestis*), брюшной тиф (*Salmonella typhi* и *S. paratyphi A*), сепсис или внекишечные местные инфекции (*S. cholerae suis*), гастроэнтерит (*Y. pseudotuberculosis*, *S. typhimurium* и *S. enteritidis*), пиелонефрит, цистит, диарею (различные патогенные линии *Escherichia coli*) и инфекционные заболевания растений (*Pseudomonas syringae*). Первичные структуры шаперона FGL и субъединицы полиадгезина были выделены из высокоразрешающей кристаллической структуры «шаперон-субъединица» (Caf2 M-Caf1) комплекса капсулы F1 *Y. pestis* до сборки [2, 3]. Кристаллическая структура комплекса «шаперон-субъединица-субъединица» (Caf1M-Caf1-Caf1), представляющая собой минимальное (первичное) волокно F1, проявляет взаимодействия между субъединицами в полиадгезинах. Что касается ворсинок, то взаимодействия «шаперон-субъединица» и «субъединица-субъединица» включают в себя дополнение (комплементацию) донорской нити: неполное складывание субъединицы дополняется донорскими последовательностями шаперона соседней субъединицы волокна. Однако субъединицы полиадгезина имеют более длинную акцепторную выемку, которая подходит для более длинных донорских нитей, со вставкой пяти,

нежели трех объемных гидрофобных боковых цепей, как в FGS-комплексах «шаперон-пилин» или «пилин-пилин». Структурный и термодинамический анализ показал, что сохраняемая шапероном энергия складывания субъединиц обеспечивает сборку волокна [3]. Имея высокую специфичность, полиадгезины являются привлекательными объектами для диагностики, вакцинации и создания препаратов [1]. Уникальные свойства полиадгезинов, поливалентное связывание и силы, обеспечивающие нековалентную сборку, могут сделать их полезными в биотехнологии и нанотехнологии. Например, полиадгезины могут быть использованы для создания новых биоматериалов со связующими свойствами. В то же время, эффективный механизм секреции полиадгезинов может быть использован для внеклеточного экспорта целевых белков и в дисплейных системах [1].

ЛИТЕРАТУРА: [1] Zavialov, A.V., Zav'yalova, G.A., Korpela, T., Zav'yalov, V.P. (2007) FGL chaperone-assembled fimbrial poly-adhesins: anti-immune armament of Gram-negative bacterial pathogens. FEMS Microb. Rev. (accepted). [2] Zavialov, A.V., Berglund, J., Pudney, A.F., Fooks, L.J., Ibrahim, T.M., MacIntyre, S., Knight, S.D. (2003) Structure and biogenesis of the capsular F1 antigen from *Yersinia pestis*: preserved folding energy drives fiber formation. Cell 113, 587-596. [3] Zavialov, A.V., Tischenko, V.M., Fooks, L.J., Brandsdal, B.O., Aquist, J., Zav'yalov, V.P., MacIntyre, S., Knight, S.D. (2005) Resolving the energy paradox of chaperone-mediated fibre assembly. Biochem. J. 389, 85-694.

POLY-ADHESINS: ANTI-IMMUNE ARMAMENT OF BACTERIAL PATHOGENS

Vladimir P. Zav'yalov¹, Anton V. Zavialov²,
Galina A. Zav'yalova¹, Timo Korpela¹

¹ Joint Biotechnology Laboratory, Department of Chemistry,
University of Turku, Turku, Finland

² Department of Molecular Biology, Swedish University
of Agricultural Sciences, Uppsala, Sweden

Attachment of bacterial pathogens to specific cells of the host is a crucial step in establishing infection. The attachment is required for colonization of host tissues and is mediated by surface-exposed adhesins. The adhesins are responsible for binding to specific receptors of host cells. Dominant class of adhesins is assembled by the conserved chaperone/usher protein secretion system. Superfamily of adhesive fimbriae formation of which is driven by periplasmic chaperone/usher machinery consists of two particular classes of organelles. One of the classes of organelles forms adhesive pili with complicated subunit (pilin) composition and only one specialized adhesive domain on the tip of pilus. The assembling of adhesive pili is assisted with the FGS (having a short F1-G1 loop) class of periplasmic chaperones. Another class of organelles forms poly-valent adhesive fimbriae of only one-two types of subunits. Their notable property is that all their subunits possess adhesive activity (poly-adhesins) [1]. The assembling of poly-adhesins is assisted with the FGL (having a long F1-G1 loop) class of periplasmic chaperones. Having binding site on each subunit, the fibers may ensure polyvalent fastening of bacteria to the host cells aggregating their receptors and triggering subversive signals which allow pathogens to evade immune defense [1]. Poly-adhesins are widely present in Gram-negative pathogens. The bacteria expressing them cause fatal systemic diseases, like bubonic and pneumonic plague (*Yersinia pestis*), enteric typhoid fever

(*Salmonella typhi* and *S. paratyphi A*), sepsis or extra-intestinal focal infections (*S. choleraesuis*), gastroenteritis (*Y. pseudotuberculosis*, *S. typhimurium* and *S. enteritidis*), pyelonephritis, cystitis, diarrhea (different pathogenic *Escherichia coli* strains), and plant infections (*Pseudomonas syringae*). First structures of the FGL chaperone and poly-adhesin subunit were derived from the high-resolution crystal structure of the chaperone-subunit (Caf1M-Caf1) pre-assembly complex of F1 capsule of *Y. pestis* [2, 3]. The crystal structure of the chaperone-subunit-subunit (Caf1M-Caf1-Caf1) complex, representing the minimal F1 fiber, revealed interactions between subunits in poly-adhesins. As in pili, chaperone-subunit and subunit-subunit interactions involve donor-strand complementation: the incomplete immunoglobulin fold of the subunit is complemented by donor sequences of the chaperone or a neighboring subunit in the fiber. However, poly-adhesin subunits have a much longer acceptor groove, which accommodates longer donor strands, inserting five rather than three bulky hydrophobic side chains as in the FGS chaperone-pilin or pilin-pilin complexes. The structural and thermodynamic analysis showed that the chaperone-preserved folding energy of subunits drives the fiber assembling [3]. Having high specificity, poly-adhesins are attractive targets for diagnostics, vaccine and drug design [1]. Unique properties of poly-adhesins, the polyvalent binding and strong yet non-covalent assembly, could make them useful in biotechnology and nanotechnology. For example, poly-adhesins could be used to design novel biomaterials with binding properties. At the same time the efficient secretion mechanism of poly-adhesins could be used for an extra-cellular export of target proteins and in display systems [1].

REFERENCES: [1] Zavialov, A.V., Zav'yalova, G.A., Korpela, T., Zav'yalov, V.P. (2007) FGL chaperone-assembled fimbrial poly-adhesins: anti-immune armament of Gram-negative bacterial pathogens. *FEMS Microb. Rev.* (accepted). [2] Zavialov, A.V., Berglund, J., Pudney, A.F., Fooks, L.J., Ibrahim, T.M., MacIntyre, S., Knight, S.D. (2003) Structure and biogenesis of the capsular F1 antigen from *Yersinia pestis*: preserved folding energy drives fiber formation. *Cell* 113, 587-596. [3] Zavialov, A.V., Tischenko, V.M., Fooks, L.J., Brandsdal, B.O., Aquist, J., Zav'yalov, V.P., MacIntyre, S., Knight, S.D. (2005) Resolving the energy paradox of chaperone-mediated fibre assembly. *Biochem. J.* 389, 655-694.

ИЗУЧЕНИЕ ПРО- И АНТИОКСИДАНТНОГО ДЕЙСТВИЯ РАЗЛИЧНЫХ ИММУНОМОДУЛЯТОРОВ НА ХЕМИЛЮМИНЕСЦЕНЦИЮ НЕЙТРОФИЛОВ

Заколяпин П.А., Зурочка А.В., Погодин Д.В., Зурочка В.А.

ГОУ ВПО Челябинская государственная медицинская академия, г. Челябинск, Россия

Актуальность. Про- и антиоксидантные воздействия на фагоцитирующие клетки являются важным элементом лечебных мероприятий при многих заболеваниях и состояниях, в том числе и воспалительных процессах. В то же время подобные влияния могут приводить к изменению защитных свойств фагоцитов, антимикробная и цитолитическая способность которых в значительной степени определяется способностью к активации процессов кислородзависимого метаболизма и генерации при этом биоксидантов, ведущую роль среди которых играют активные формы кислорода, которые, с одной сто-

роны в значительной степени обеспечивают защитные, микробицидные эффекты фагоцитов, а с другой стороны, могут выступать факторами аутоклеточной и тканевой деструкции. Механизм кислородзависимого метаболизма фагоцитов во многом изучен [Маянский А.Н., Маянский Д.Н., 1979]. Но в то же время остается малоисследованным влияние различных химических соединений на про- и антиоксидантную активность фагоцитов.

Целью данного исследования явилось изучение дозозависимых эффектов различных иммуномодуляторов на хемилюминесценцию нейтрофилов.

Изучали действие различных иммуномодуляторов (парлазол, галавит, полиоксидоний, нуклеинат натрия, бестим, циклоферон) в тесте люминолзависимый спонтанный и латексиндуцированной хемилюминесценции нейтрофилов доноров. Исследования проведены на 21 донорской крови и 15 больных. Дозы препаратов были рассчитаны по формуле [Чукичев А.В. и соавт., 1986] и применялись в концентрации 50%, 100%, и 150% от расчетной. Учет результата проводился на люминесцентном анализаторе ZENYTH 1100.

Все изученные иммуномодуляторы обладали прооксидантными свойствами – стимулировали спонтанную и индуцированную хемилюминесценцию нейтрофилов. При изучении дозозависимых эффектов препаратов было выявлено, что у доноров максимум действия препаратов пришелся на расчетную и 50-кратную концентрацию препаратов. Малая концентрация препаратов оказывала прооксидантное действие, незначительно усиливая спонтанную хемилюминесценцию нейтрофилов и практически не изменяя индуцированную хемилюминесценцию нейтрофилов. При оценке действия иммуномодуляторов на хемилюминесценцию нейтрофилов больных было выявлено, что у ряда препаратов в расчетной концентрации не выявляется прооксидантного действия и даже в некоторых случаях проявляются антиоксидантные свойства. Только 2 препарата – галавит и нуклеинат натрия либо сохраняли прооксидантное действие, либо не влияли на хемилюминесценцию нейтрофилов больных. Такие эффекты различных иммуномодуляторов могут быть связаны с несколькими механизмами: во-первых, у больных как правило повышена спонтанная и снижена индуцированная хемилюминесценция нейтрофилов и на таком фоне действие иммуномодуляторов может носить дозозависимый эффект или вызывать снижение кислородзависимых реакций фагоцитов.

По-видимому действие нуклеината натрия и галавита имеет несколько иной механизм воздействия на хемилюминесценцию нейтрофилов и не вызывает депрессии данной функции нейтрофилов.

ВЛИЯНИЕ НЕЙТРОФИЛОКИНОВ НА ЛАБИЛИЗАЦИЮ ЛИЗОСОМНЫХ МЕМБРАН МАКРОФАГОВ В ПРОЦЕССЕ ФОРМИРОВАНИЯ ПРОТИВОЧУМНОГО ИММУНИТЕТА

Иванова И.А., Васильева Г.И., Беспалова И.А., Киселёва А.К., Дорошенко Е.П.

ФГУЗ научно-исследовательский противочумный институт, г. Ростов-на-Дону, Россия

Введение. Цитокининдуцирующая активность нейтрофилов (Нф) стала изучаться только в последние десятилетия [Долгушин И.И. и др., 1990-1997; Васильева Г.И. и др., 1998;

Третьякова И.Е., 2004; Delgado A.V. et al., 2002]. К настоящему времени установлено, что активированные Нф способны синтезировать и продуцировать молекулы с активностями, подобными имеющимся у уже известных цитокинов – ИЛ-1, ИЛ-3, ИЛ-8, ФНО α , Г-КСФ, ГМ-КСФ и др., регулируя клеточные функции [Нестерова И.В., 2004; Al-Mohanna F. et al., 2002; Тутуз А.Р., 2002]. Эти цитокины, синтезируемые Нф, участвуют в кооперативном взаимодействии клеток фагоцитарной системы, действуя как паракринно на макрофаги (Мф), так и аутокринно (на Нф). Индукторами их синтеза могут быть как экзогенные факторы, например, микроорганизмы, вызывающие «раннюю волну» их продукции, так и эндогенные, в частности, цитокины, опосредующие «позднюю волну» [Потапнев М.П., 1995; Goto F. et al., 1988].

Цель и задачи исследования. Изучение влияния нейтрофилокинов (НК) на лабильзацию лизосомных мембран перитонеальных Мф при первичном и вторичном иммунном ответе на *Yersinia pestis EV*.

Материалы и методы. Исследования выполняли на перитонеальных Мф и Нф беспородных мышей. В качестве индуктора синтеза НК использовали м.к. *Y. pestis EV*. Супернатанты, содержащие НК, получали центрифугированием культур клеток при 1000 g в течение 10 минут с последующим фильтрованием через мембранные фильтры с диаметром пор 0,22 мкм. Отдельные фракции нейтрофилокинов (ФНфК) выделяли путем гель-хроматографического разделения их суммарного пула на оборудовании фирмы LKB [Uvicord II, LKB, Швеция]. Влияние ФНфК на активность лизосом оценивали в однослойной культуре клеток по их способности включать флюоресцирующий краситель акридиновый оранжевый. В каждом варианте экспериментов просматривали по 300 клеток в опыте и контроле (с добавлением нейтрофилокинов и без них). Учитывали процент клеток, содержащих ярко-оранжевые гранулы — лизосомы. Количество лизосом в клетках выражали в условных единицах (у.е.) [Khavkin T.N. et al., 1977].

Основные результаты. Исследование влияния ФНфК на лизосомный аппарат Мф свидетельствует о том, что при первичном иммунном ответе ФНфК, продуцируемые в ответ на воздействие м.к. *Y. pestis EV*, оказывают слабое влияние на лизосомы Мф. В то же время при вторичном иммунном ответе они обуславливают более выраженное снижение числа лизосомных гранул в одной клетке в сравнении с контролем (2,63±0,4 у.е. и 2,92±0,4 у.е. соответственно), не влияя на процент клеток, содержащих лизосомы. Это может быть объяснено лабильзацией лизосомных мембран Мф, что имеет положительное значение, так как такие изменения мембран являются показателем активации не только обменных процессов в клетке, но и защитных механизмов, обеспечивающих захват и уничтожение чужеродных агентов с помощью кислых гидролаз и катионных белков лизосом. Вероятно, для лабильзирующего воздействия нейтрофилокинов на лизосомную мембрану Мф необходима «подготовленность» последних, которая развивается в результате иммунизации животных вакцинным штаммом чумного микроба.

Заключение. Анализ представленных результатов свидетельствует о том, что при вторичном иммунном ответе ФНфК содержат нейтрофилокины, воздействующие на лизосомные мембраны Мф в концентрациях, достаточных для подготовки к слиянию лизосом с фагосомами и выходу лизосомных ферментов в образовавшуюся фаголизосому.

ОЦЕНКА ИММУННОГО ОТВЕТА МЫШЕЙ НА АУТОЛОГИЧНЫЕ СПЛЕНОЦИТЫ, СТИМУЛИРОВАННЫЕ *IN VITRO*, В РЕАКЦИИ ГИПЕРЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ ЗАМЕДЛЕННОГО ТИПА

Ильина Н.А., Кожевников В.С., Гойман Е.В., Кудяева О.Т., Колесникова О.П.

Институт клинической иммунологии СО РАМН, г. Новосибирск

Введение. Важную роль в предотвращении развития аутоиммунных заболеваний играют периферические иммунорегуляторные механизмы, способные ограничить экспансию аутореактивных Т-лимфоцитов. В формировании регуляторной сети участвуют антиидиотипические Т-клетки, распознающие идиотип, ассоциированный с Т-клеточным рецептором, и антиэрготипические клетки, которые супрессируют Т-лимфоциты путем, не связанном с распознаванием идиотипических детерминант. Антиэрготипические клетки менее изучены, но известно, что они взаимодействуют с аутологичными активированными клетками (не покоящимися), вне зависимости от их антигенной специфичности. Известно, что они реагируют на экспрессию на поверхности активированных Т-клеток маркера активации, названного эрго-топом. В качестве эрготопа рассматриваются молекулы CD25 (альфа цепь рецептора IL-2), CD122 (бета цепь рецептора IL-2), HSP60. В работах по изучению антиэрготипического ответа показано существование антиэрготипических клеток *in vitro*.

Цели и задачи: исследовать антиэрготипический ответ у мышей (*in vivo*) на введение аутологичных активированных *in vitro* спленоцитов в реакции гиперчувствительности замедленного типа (ГЗТ).

Материалы и методы. В работе использовали мышей-самцов линии DBA/2. Спленоциты культивировали в полной среде с добавлением конканавалина А в концентрации 5 мкг/мл. На 3 сутки замена 70% среды на новую с таким же составом. На 6 сутки клетки собирали. Мыши были разделены на 3 группы: 1 группа — опытные (иммунизированы подкожно аутологичными активированными спленоцитами 1 раз в неделю 2×10^7 клеток в течение 4 недель), 2 группа — контрольные (иммунизированы интактными спленоцитами 1 раз в неделю 2×10^7 клеток в течение 4 недель), 3 группа — интактные мыши. Затем 1 и 3 группе под апоневроз задней лапы вводили 2×10^7 активированных спленоцитов, мышам 2 группы 2×10^7 интактных спленоцитов. Учет реакции ГЗТ через 24, 48, 72 ч. Статистическая обработка полученных данных проводилась с использованием программы STATISTICA, version 5, с применением критерия Wilcoxon и методов описательной статистики.

Основные результаты. Отмечено, что средний уровень реакции ГЗТ у мышей в опытной группе, иммунизированной активированными спленоцитами, достоверно выше ($p < 0,05$) через 24, 48 ч по сравнению с контрольной и интактной группами. Через 72 ч достоверных различий не получено.

Выводы. Развитие реакции ГЗТ в ответ на введение аутологичных активированных *in vitro* спленоцитов свидетельствует о существовании иммунного ответа, направленного против аутологичных активированных антиген-неспецифических клеток. Полученные результаты указывают на возможность изучения антиэрготипического ответа *in vivo*.

КОМБИНИРОВАННАЯ ВАКЦИНА ПРОТИВ ВИЧ-1 НА ОСНОВЕ ПОЛИЭПИТОПНОГО БЕЛКА И ДНК-ВАКЦИНЫ. ДИЗАЙН И ДОКЛИНИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

Ильичев А.А., Карпенко Л.И., Ужаченко Р.В., Лебедев Л.Р., Плясунова О.А., Даниленко Е.Д., Масычева В.И., Бажан С.И.

ФГУН Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора, п. Кольцово, Новосибирская область, Россия

Один из многообещающих подходов в создании новой генерации эффективных и безопасных вакцин основан на идентификации в вирусных белках Т- и В-клеточных эпитопов и конструирование на их основе синтетических полиэпитопных вакцин. Такие вакцины должны быть свободны от недостатков, которые свойственны вакцинам, создаваемым на основе аттенуированного или инактивированного вирусов или же на основе нативных и рекомбинантных вирусных белков. В частности, они не будут содержать нежелательных эпитопов, которые индуцируют иммунопатологию или ингибируют протективный иммунитет.

В ГНЦ ВБ «Вектор» были сконструированы полиэпитопные ВИЧ-1 иммуногены ТВ1 and ТС1, предназначенные для стимуляции гуморального и клеточного ответа. Иммуногены ТВ1 и ТС1 были использованы для создания новой вакцины КомбиВИЧвак (комбинированная ВИЧ-1 вакцина). КомбиВИЧвак является вирусоподобной частицей, содержащей внутри DNA вакцину рсDNA-ТС1 и покрытую оболочкой из конъюгата спермидин-полиглокин-ТВ1. Были исследованы иммуногенные и токсические свойства вакцины КомбиВИЧвак. Показано, что КомбиВИЧвак индуцирует строгий гуморальный и клеточный ответ у мышей, антитела высоко специфичны и обладают способностью нейтрализовать вирус *in vitro*. Доклинические исследования продемонстрировали, что КомбиВИЧвак не вызывает длительно сохраняющихся изменений в организме животных и, таким образом, вакцина может быть рекомендована для проведения клинических испытаний.

ЛИМФОЦИТЫ ЧЕЛОВЕКА УЗНАЮТ И УБИВАЮТ HLA- ОПУХОЛЕВЫЕ КЛЕТКИ: НОВАЯ ФУНКЦИЯ БЕЛКА TAG7(PGRP-S)

Кабанова О.Д.¹, Лукьянова Т.И.¹, Духанина Е.А.², Шаталов Ю.В.¹, Яшин Д.В.^{1,3}, Романова Е.А.¹, Хайдуков С.В.⁴, Гнучев Н.В.¹, Сащенко Л.П.¹

¹ *Институт биологии гена РАН, Москва, Россия*

² *Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН, Москва, Россия*

³ *Центр медицинских исследований, Университет Осло, Норвегия*

⁴ *Институт бионеорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва, Россия*

Tag7 (PGRP-S – peptidoglycan recognition protein) широко распространен в природе, важен для врож-

денного иммунитета. Связываясь с пептидогликаном бактерий, участвует в их уничтожении. Мы показали противоопухолевое действие Tag7(PGRP-S). При взаимодействии с опухолевыми клетками лимфоциты выделяют этот белок в среду. Tag7(PGRP-S) образует с Hsp70 стабильный комплекс, обладающий цитотоксическим действием на некоторые линии опухолевых клеток.

Цель нашей работы заключается в характеристике механизмов гибели HLA несодержащих опухолевых клеток (HLA⁻) под действием лимфокин-активированных киллеров.

Материалы и методы. Лимфоциты выделяли в градиенте плотности Ficoll-Paque (Amersham), популяции лимфоцитов CD4⁺CD25⁺, CD3⁺CD8⁺ – магнитной сепарацией (Dyna). Экспрессию поверхностных антигенов CD4⁺, CD25⁺, CD3⁺, CD8⁺, Tag7, Fas-FasL анализировали на проточном цитофлуориметре (Epics Elite Coulter). Зону контакта лимфоцита и клетки-мишени K562 регистрировали с помощью конфокального микроскопа (Leica).

Результаты. Мы изучали влияние лимфоцитов, выделенных из периферической крови человека и инкубированных в течение 6 сут с IL-2, на опухолевые клеточные линии Fas⁺: K562 и MOLT-4, а также Fas⁻ L929. Исследования гибели опухолевых клеток показали, что как CD4⁺, так и CD8⁺ субпопуляции лимфоцитов могут убивать HLA-негативные опухолевые клетки K562 и MOLT-4. Поверхностный белок Tag7(PGRP-S) лимфоцитов с фенотипом CD4⁺CD25⁺ узнает и специфически связывается с белком Hsp70 на поверхности клеток-мишеней. Это связывание обеспечивает взаимодействие Fas-FasL, приводящее к апоптозу. Эта новая функция Tag7 и Hsp70 дает дополнительное средство усиления антиопухолевой защиты против HLA⁻ опухолевых клеток

Лимфоциты могут поражать как Fas⁺, так Fas⁻ клетки. Лимфоциты с фенотипом CD3⁺CD8⁺ на своей поверхности не несут Tag7, однако в кондиционной среде обнаруживаются белки от 17 до 90 kDa, токсичные для Fas- опухолевых клеток. Секретия этих белков осуществляется через аппарат Гольджи, и в регуляции этой секретии участвует поверхностный FasL. Данные MALDI масс-спектрометрии подтвердили наше предположение: цитолитические белки лимфоцитов – продукты протеолитической деградации исходного комплекса Tag7(PGRP-S)/Hsp70. Мы обнаружили также что большинство этих белков содержат фрагменты, соответствующие 4-65 и 147-162 аминокислотам Tag7(PGRP-S), а также 272-319 и 509-566 аминокислотам Hsp70. Антитела к Tag7 и Hsp70 полностью снижали цитотоксичность лимфоцитарных белков.

Полученные результаты позволяют сделать следующие **выводы** относительно функций Tag7(PGRP-S):

1) Tag7(PGRP-S) регуляторных CD4⁺CD25⁺ лимфоцитов принимает участие в узнавании Hsp70, находящегося на поверхности HLA⁻-опухолевых клеток.

2) Цитотоксичные лимфоциты (CD3⁺CD8⁺), выделяющие в кондиционную среду растворимые фрагменты Tag7(PGRP-S)/Hsp70 комплекса, участвуют в механизме лизиса Fas⁻-клеток.

ПЕПТИДНЫЕ ФРАГМЕНТЫ БЕЛКА ТЕПЛООВОГО ШОКА 70 УСИЛИВАЮТ ПРОДУКЦИЮ ГАММА-ИНТЕРФЕРОНА И МОДУЛИРУЮТ ЭКСПРЕССИЮ ПОВЕРХНОСТНЫХ МАРКЕРОВ В НК-КЛЕТКАХ

Каневский Л.М., Власкин П.А., Алексеева Л.Г., Некрасов А.Н., Стрельникова Ю.И., Сапожников А.М., Коваленко Е.И.

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

Введение. В настоящее время белок теплового шока семейства 70 kDa (БТШ70) считают одним из активаторов натуральных киллеров (НК-клеток). Ранее нами было установлено, что в определенных условиях БТШ70 способен вызывать повышение продукции гамма-интерферона (IFN γ) в НК-клетках человека. Известно также, что БТШ70 стимулирует пролиферацию, хемотаксис и цитотоксичность НК-клеток.

Цель и задачи. Целью данной работы явилось дальнейшее изучение влияния БТШ70 на натуральные киллеры человека с использованием пептидных фрагментов этого белка. Были поставлены следующие задачи: 1) исследовать, какие фрагменты молекулы БТШ70 ответственны за повышение продукции IFN γ ; 2) изучить, проникает ли экзогенный БТШ70 внутрь НК-клеток (феномен интернализации БТШ); 3) выяснить, влияют ли БТШ70 и его фрагменты на экспрессию поверхностных маркеров НК-клеток.

Материалы и методы. Высокоочищенную популяцию НК-клеток получали путем магнитной сепарации фракции мононуклеарных клеток, выделенных из периферической крови здоровых доноров. Экспрессию поверхностных маркеров НК-клеток определяли методом проточной цитометрии. Продукцию IFN γ и интернализацию БТШ70 оценивали путем внутриклеточного окрашивания с последующим цитофлуориметрическим анализом.

Результаты. При оценке экспрессии CD94, одного из кандидатов на роль рецептора БТШ70, а также поверхностных маркеров НК-клеток CD16 и CD56 под действием БТШ70, выяснилось, что белок теплового шока заметно модулирует экспрессию всех трех маркеров. С использованием биотинилированного БТШ70 было показано, что стимулированные IL-2 НК-клетки более активно интернализуют экзогенный БТШ70. При одновременной стимуляции НК-клеток БТШ70 (0,05-5 мкг/мл) и IL-2 (600 ед/мл) наблюдалось значительное повышение внутриклеточного содержания IFN γ . С целью выявления пептидных фрагментов молекулы БТШ70, опосредующих увеличение продукции IFN γ в НК-клетках, было синтезировано шесть пептидов. При выборе последовательности аминокислотных остатков руководствовались данными, полученными с помощью метода анализа информационной структуры последовательности индуцируемой формы БТШ70. Этот недавно предложенный метод предполагает поиск в молекуле данного белка последовательностей остатков аминокислот, характеризующихся повышенным уровнем плотности структурной информации [1]. Пептиды добавляли к НК-клеткам в концентрации 2 мкг/мл и инкубировали в течение 24 ч в присут-

ствии IL-2. Из шести полученных пептидов два (399-408 и 411-424) вызывали БТШ70-подобное повышение продукции IFN γ . Кроме того, эти же два пептида модулировали экспрессию маркеров так же, как и БТШ70.

Заключение. Таким образом, нами были определены фрагменты молекулы белка теплового шока 70, предположительно ответственные за увеличение продукции IFN γ НК-клетками. Действие БТШ70 и его фрагментов приводило к изменению экспрессии рецепторов CD16 и CD94, а также молекул адгезии CD56. Активированные IL-2 НК-клетки демонстрировали больший уровень интернализации БТШ70 по сравнению с неактивированными клетками. Возможно, проникновение БТШ70 внутрь клеток, стимулированных IL-2, и является начальным событием, приводящим к БТШ-зависимой активации НК-клеток.

Работа выполнена при поддержке РФФИ (грант № 06-04-49568).

ИССЛЕДОВАНИЕ РОЛИ IL-11 В РЕГУЛЯЦИИ ИММУННОГО ОТВЕТА ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ТУБЕРКУЛЕЗНОЙ ИНФЕКЦИИ

Капина М.А., Шепелькова Г.С., Авдиенко В.Г., Гусева А.Н., Сосунов В.В., Апт А.С., Лядова И.В.

ГУ ЦНИИ туберкулеза РАМН, Москва, Россия

Цитокины являются мощными регуляторами иммунного и воспалительного ответа. Одним из цитокинов, обладающих иммунорегуляторной активностью, является IL-11. IL-11 – плеiotропный цитокин, участвующий в регуляции кроветворения, костеобразования и иммунного ответа. В частности, IL-11 ингибирует продукцию провоспалительных цитокинов (IL-1 β , IL-12, TNF α) и IFN γ , стимулирует секрецию IL-10 и IL-4 и сдвигает Т-клеточный ответ в сторону образования лимфоцитов Th2. В связи с этим исследуется возможность использования IL-11 при трансплантации костного мозга, восстановлении после курсов химиотерапии и облучения, а также для лечения таких заболеваний, как артрит, колит, астма, болезнь Лайма. Влияние IL-11 на течение туберкулезной инфекции до настоящего времени не исследовалось.

В предыдущих работах нашей лаборатории было показано, что мыши различных линий различаются по уровню экспрессии IL-11 и что туберкулезная инфекция стимулирует его экспрессию в легочной ткани. В частности, было показано, что у мышей I/St, генетически чувствительных к туберкулезу, отмечается более высокий уровень экспрессии IL-11, чем у мышей линии A/Sp, резистентных к туберкулезу. В связи с этим в настоящей работе исследовали роль IL-11 в противотуберкулезном иммунном ответе.

Исследования проводили на мышях линии I/St. Мышей инфицировали путем интратрахеального введения 10⁵ КОЕ *M. tuberculosis* штамма H37Rv. Инфицированным мышам шестикратно внутрибрюшинно вводили контрольные антитела или антитела, специфичные к IL-11.

О влиянии антител, специфичных к IL-11, на течение туберкулезного процесса судили по потере веса, поражению легочной ткани и количеству микобактерий в легких мышей контрольной и опытной групп.

В связи с тем, что при туберкулезе потеря веса (кахексия) является важным прогностическим критерием, этот показатель использовали в качестве основного при оценке влияния IL-11 на течение инфекции. Исследования выявили, что через 24 дня после инфицирования у большинства мышей контрольной группы наблюдалась значительная потеря веса (в среднем на 5,2%), в то время большинство мышей подопытной группы набрали вес (средний показатель по группе – 1,4%). Помимо уменьшения степени кахексии, введение анти-IL-11 антител приводило к уменьшению инфильтративных изменений в легочной ткани (площадь инфильтративных изменений составила 28% в контрольной группе и 20% в подопытной группе) и снижению микобактериальной нагрузки в легких (450×10^6 КОЕ/на долю легкого в контрольной группе и 120×10^6 КОЕ/на долю легкого в подопытной группе). Введение анти-IL-11 антител приводило также к изменению клеточного состава инфильтрата: хотя обе группы не отличались по содержанию в легких лимфоцитов CD4⁺ и CD8⁺, однако в подопытной группе отмечалось снижение содержания лимфоцитов CD19⁺ и нейтрофилов, а также тенденция к увеличению количества легочных макрофагов. На фоне повышенной инфильтрации, у контрольной группы была отмечена тенденция к снижению количества лимфоцитов CD4⁺CD27⁻, продуцирующих IFN γ .

Экспрессия провоспалительных цитокинов TNF α , IL-6 и хемокинов MIP-1 α , MIP-1 β , MIP-2 была выше у мышей контрольной группы, чем у мышей подопытной группы. В целом у мышей I/St, характеризующихся высоким исходным уровнем продукции IL-11, введение антител, специфичных к IL-11, приводило к снижению и изменению характера воспалительных реакций в легочной ткани, что сопровождалось более мягким течением туберкулезной инфекции.

Таким образом, полученные нами данные свидетельствуют о том, что в условиях повышенной продукции IL-11, введение антител приводит к снижению чрезмерно выраженного локального воспаления в легочной ткани и к снижению тяжести течения туберкулезного процесса.

МУКОЗАЛЬНАЯ ВИЧ-1 ПОЛИЭПИТОПНАЯ ДНК-ВАКЦИНА В СУППОЗИТОРНОЙ ФОРМЕ. ДИЗАЙН И ДОКЛИНИЧЕСКИЕ ИСПЫТАНИЯ

Карпенко Л.И., Веремейко Т.А., Левагина Г.М., Даниленко Е.Д., Бажан С.И., Ильичев А.А.

ФГУН Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора, п. Кольцово, Новосибирская область, Россия

Поверхность слизистой оболочки является главным естественным местом проникновения ВИЧ-1, а толстая кишка является основным местом репликации ВИЧ-1. Поэтому, успешная ВИЧ вакцина должна быть способна индуцировать мукозальный иммунитет. Стратегия иммунизации с использованием аттенуированной сальмонеллы для доставки полиэпитопной ДНК-вакцины может быть эффективной для индуцирования защит-

ного В- и Т-клеточного ответа против передачи ВИЧ-1 половым путем.

Ранее мы сконструировали полиэпитопный белок TCI (CTL immunogen), содержащий около 80-ти CTL эпитопов ВИЧ-1, которые рестриктированы десятью различными молекулами HLA I и включают последовательности из белков Env, Gag, Pol и Nef. Ген, кодирующий белок TCI, был клонирован в составе ДНК-вакцинного вектора (pcDNA-TCI). Кандидатная вакцина Сал-ВИЧ Д была сконструирована в виде суппозитория, активным компонентом которых стал рекомбинантный аттенуированный штамм *S. enteritidis* E23, несущий ДНК вакцину pcDNA-TCI. Доклинические испытания были проведены согласно требованиям ВОЗ и включали исследование иммуногенности, изучение токсичности и персистенции. Доза, способ иммунизации и схема введения были такие и же, которые предназначались для клинического использования. Мы рекомендовали двукратную ректальную иммунизацию (с интервалами 28 дней), доза 107 CFU *S. enteritidis* E23-pcDNA-TCI в суппозитории.

Суппозитории Сал-ВИЧ Д индуцируют формирование вирус-специфических антител и стимулируют ВИЧ-1 специфический CTL ответ у иммунизированных животных (данные ELISA и ELISpot (IFN γ , IL-2 и IL-4)). Антитела были способны нейтрализовать ВИЧ-1 *in vitro*. Перектальное введение вакцины Сал-ВИЧ Д не оказывало неблагоприятных воздействий на физиологические, гематологические или биохимические параметры экспериментальных животных.

Доклинические испытания продемонстрировали, что Сал-ВИЧ Д индуцирует вирус-специфический гуморальный и CTL-ответ и не оказывает неблагоприятный воздействия на иммунизированных животных.

ИССЛЕДОВАНИЕ ЭФФЕКТИВНОСТИ ПРИМЕНЕНИЯ СПЕЦИФИЧЕСКОЙ И НЕСПЕЦИФИЧЕСКОЙ ИММУНОТЕРАПИИ У МЫШЕЙ-ОПУХОЛЕНОСИТЕЛЕЙ ПРИ ГИПЕРТЕРМИЧЕСКОМ ВОЗДЕЙСТВИИ

Кащенко Э.А., Самарин Д.М., Селедцова Г.В., Шишков А.А., Повещенко О.В.

ГУ НИИ клинической иммунологии РАМН, г. Новосибирск, Россия

Введение. Существует несколько подходов в лечении онкозаболеваний. Оперативное удаление, лучевая и химиотерапия – наиболее общепринятые методы борьбы со злокачественными опухолями. Наиболее перспективной на сегодняшний день является иммунотерапия: неспецифическая, базирующаяся на применении разного рода иммуностимуляторов, и специфическая, основанная на применении противоопухолевых вакцин. Результаты, полученные при иммунотерапии опухолей, достаточно обнадеживающие, и имеют некоторые преимущества перед традиционной радио- и химиотерапией. Однако ее сочетание с другими методами лечения изучено недостаточно.

Гипертермическое воздействие индуцирует апоптоз в опухолевых клетках и значительно усиливает противоопухолевое действие химиотерапевтических средств. Препараты, не эффективные в нормотермических ус-

ловиях, оказались эффективны в условиях гипертермии. За счет индукции белков теплового шока при тепловом стрессе повышается иммуногенность опухоли. Находясь на поверхности опухолевой клетки, они могут функционировать посредством активации естественных киллеров и Т-клеток; как антигенпрезентирующие молекулы — осуществлять специфические иммунные реакции. Однако гипертермическое воздействие оказывает также негативное влияние на организм, приводя к иммуносупрессии. Таким образом, очевидно, что иммунотерапия позволяет преодолеть иммуносупрессию, а гипертермическое воздействие — повысить иммуногенность опухоли.

В связи с этим представляет интерес изучение сочетания иммунотерапевтического подхода с гипертермическим воздействием на организм — опухоленоситель, что возможно позволит потенцировать сильные стороны каждого метода и нивелировать отрицательные.

Целью настоящего исследования является определение влияния гипертермии в сочетании со специфической и неспецифической иммунотерапией у мышей-опухоленосителей на опухолевый рост и функциональную клеточную активность.

Материалы и методы. Мышам-опухоленосителям (меланомы В16) вводили трехкратно с интервалом 3 дня лиофилизированный лизат мышины меланомы В16 (5×10^6) в качестве специфической иммунотерапии или ИЛ-2 (500 ед/мышь) при неспецифической иммунотерапии. Гипертермическое воздействие проводилось однократно через 7 дней после привития опухоли при температуре 42°C в течение 30 мин.

Оценивали вес опухоли и бласттрансформацию спленоцитов на опухолевые антигены меланомы мыши.

Результаты. При сочетанном применении иммунотерапии и гипертермического воздействия результат зависел от срока проведения иммунотерапии. При проведении специфической иммунотерапии до гипертермического воздействия вес опухоли у мышей меньше, чем в контрольной группе, в 1,6 раза. Однако если вакцинацию проводили после гипертермического воздействия, масса опухоли уменьшалась в 4,6 раза по сравнению с контролем.

Применение неспецифической иммунотерапии до гипертермического воздействия приводит к уменьшению опухолевой массы в 2,8 раза по сравнению с контролем. Если же ИЛ-2 вводили животным после гипертермического воздействия, вес опухолевой массы не уменьшался.

Зарегистрировано повышение уровня пролиферации спленоцитов на меланомный антиген в группе мышей, получавших аутологичную вакцину. Индекс стимуляции пролиферации в 1,5 раза больше, чем в контрольной группе мышей. В других группах увеличение уровня пролиферации спленоцитов не обнаружено.

Заключение. Проведение специфической иммунотерапии после гипертермического воздействия и неспецифической иммунотерапии до гипертермического воздействия приводит к уменьшению опухолевой массы у мышей-опухоленосителей. Проведение специфической вакцинации у мышей-опухоленосителей оказывает влияние на функциональную клеточную активность.

ВЛИЯНИЕ РАЗЛИЧНЫХ СПОСОБОВ ИММУНОКОРРЕКЦИИ ЧУМНОГО ТОКСИЧЕСКОГО ШОКА НА АКТИВНОСТЬ КИСЛОРОДЗАВИСИМЫХ МЕХАНИЗМОВ В ИММУНОКОМПЕТЕНТНЫХ КЛЕТКАХ

Киселёва А.К.

ФГУЗ научно-исследовательский противочумный институт, г. Ростов-на-Дону, Россия

Клинические исследования показали, что предотвратить септический шок, осложняющий течение инфекционных заболеваний, вызванных грамотрицательными микроорганизмами, в том числе чумной инфекции, и снизить уровень смертности с помощью кортикостероидных гормонов не удается [Bone R., Fisher C., Clemmer T. et al.; 1987, Айкимбаев А.М и др., 1985]. В связи с этим для иммунотерапии предлагают использовать цитокины [Фрейдлин И.С., 1995]. Мы установили, что хелперные фракции нейтрофилокинов (НК) предотвращают гибель экспериментальных животных от чумного токсического шока.

Сигнальные механизмы, которые включаются в иммунокомпетентных клетках (ИКК) при внедрении патогена, приводят к активации ферментных систем, вырабатывающих активные кислородные метаболиты (АКМ), в результате деятельности которых образуются токсические для клетки перекиси. Другие ферментные системы восстанавливают перекисные соединения и тем нейтрализуют их.

Глюкокортикоидные гормоны — физиологические индукторы апоптоза ИКК — непосредственно стимулируют НАДФН-оксидазу, увеличивая в клетках концентрацию супероксидного радикала и других АКМ [Персианова В.О. и др., 1998]. Цитокиновые рецепторы, связавшись с лигандами, запускают трансдукцию сигнала, который также может вызвать активацию комплекса ферментов НАДФН-оксидазы, как это установлено для ФНО α [Berkow R., Doobson R., 1988].

Цель настоящего исследования заключалась в оценке функциональной активности макрофагов перитонеального экссудата (ПМф) белых мышей и морских свинок, находящихся в состоянии эндотоксинового шока, вызванного введением ЛПС чумного микроба, и выживших после терапии гидрокортизоном и гомологичными хелперными фракциями нейтрофилокинов.

Функциональную активность макрофагов оценивали в тетразолиевом тесте [Чесноков В.А., Воскресенский А.М., Свиридов Л.П., 1985]. Установлено, что у нормальных белых мышей активность супероксиддисмутазы (СОД) в 3 раза ниже, чем у интактных морских свинок (20,3 и 6.42 усл. ед. соответственно). Введение ЛПС чумного микроба, гидрокортизона и гомологичных хелперных фракций НК вызывало достоверное увеличение активности СОД в ПМф мышей, а у выживших через 24 часа, благодаря терапии гидрокортизоном и НК, активность снижалась до уровней близких к норме.

Напротив, у морских свинок активность этой группы ферментов уменьшалась при введении ЛПС, гидрокортизона, НК и еще более снижалась в группе свинок, выживших после терапии эндотоксинового шока гидрокортизоном. Только в группе морских свинок, выживших после токсического шока благодаря инъекции хелперных фракций НК, активность СОД восстанавливалась до уровней близких к норме.

Статистическая обработка результатов исследований с помощью непараметрических критериев статистики [Губ-

лер Е.В., Генкин А.А., 1973] доказала достоверность различий и подтвердила, что генетически детерминированные видовые отличия в уровне активности факторов неспецифической резистентности имеют важное значение как в патогенезе чумной интоксикации, так и в уровне участия тех или иных механизмов неспецифической защиты и в порядке их включения в процесс восстановления гомеостаза.

СРАВНИТЕЛЬНО-БИОЛОГИЧЕСКИЙ ПОДХОД В ИЗУЧЕНИИ АНТИГЕННЫХ ДЕТЕРМИНАНТ ТИРЕОГЛОБУЛИНА (ТГ)

**Климович В.Б., Пиневиц А.А., Руденко И.Я.,
Шашкова О.А.**

*ФГУ Центральный научно-исследовательский
рентгено-радиологический институт ФАЗСР РФ,
Санкт-Петербург, Россия*

При исследовании эпитопной специфичности моноклональных антител (МКАТ) как правило выявляют группы реагентов, которые взаимно ингибируют взаимодействие с антигеном. Способность одних МКАТ конкурировать с другими может указывать либо на совпадение их эпитопной направленности, либо на топографическую близость распознаваемых ими детерминант на молекуле антигена. Для анализа состава групп взаимного ингибирования обычно используют природные, синтетические или рекомбинантные фрагменты антигена. В случае ТГ такой подход не применим, т.к. структура многих эпитопов зависит от конформации и при фрагментировании молекулы утрачивается. В настоящей работе для анализа состава групп взаимного ингибирования был применен подход, основанный на сопоставлении данных об эпитопной специфичности МКАТ и об их перекрестной реактивности с ТГ животных разных видов.

Панель из 52 МКАТ против ТГ человека была получена в лаборатории на основе иммунных лимфоцитов мышей линии SJL/J [Климович В.Б. и др., 1999]. Специфичность МКАТ в отношении эпитопов ТГ исследовали методом конкурентного ИФА. Способность МКАТ взаимодействовать с ТГ семи видов млекопитающих, двух видов птиц и одного вида амфибий изучали методом непрямого твердофазного ИФА и иммуногистохимически на срезах тканей щитовидных желез.

Двадцать МКАТ ингибировали связывание с антигеном только одноименных меченых реагентов, из чего следовало, что они распознают отдельные пространственно изолированные эпитопы.

Тридцать два МКАТ были объединены в 14 групп, в которых каждое из немеченых антител ингибировало взаимодействие с антигеном двух и более меченых МКАТ.

В пределах семи групп МКАТ, взаимно ингибируя связывание с ТГ человека, различались по видовой специфичности: распознаваемые ими эпитопы были представлены на ТГ животных одних видов, но отсутствовали на других. Это позволило заключить, что МКАТ в указанных группах направлены против разных топографически сближенных эпитопов молекулы ТГ человека.

МКАТ в оставшихся семи группах взаимного ингибирования обладали одинаковой видовой специфичностью: связывающие их эпитопы не встречались порознь на ТГ животных изученных видов. Следовательно, каждая

из указанных групп содержит МКАТ, обладающие идентичной эпитопной специфичностью.

В целом МКАТ, составляющие 14 групп взаимного ингибирования, распознают двадцать одну антигенную детерминанту молекулы ТГ человека. Эти эпитопы сосредоточены на удаленных друг от друга или взаимно перекрывающихся участках поверхности антигена.

Использованный в настоящей работе подход к анализу групп взаимного ингибирования может быть применен при исследовании целого ряда эволюционно консервативных антигенов, обладающих высокой степенью межвидовой гомологии.

Исследование выполняется при поддержке РФФИ (грант № 05-04-48862).

ПЕПТИДНО-ПОЛИСАХАРИДНЫЕ КОНЬЮГАТЫ КАК КАНДИДАТЫ АНТИГЕНОВ ДЛЯ ПОЛИВАЛЕНТНОЙ МЕНИНГОКОККОВОЙ ВАКЦИНЫ

**Котельникова О.В., Чибискова О.В., Несмеянов
В.А., Аллилуев А.П., Филатова М.П., Короев Д.О.,
Большина О.М.**

*Институт биоорганической химии
им. акад. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН*

Отсутствие до настоящего времени эффективной вакцины против менингококка серогруппы В заставляет продолжать поиск новых протективных антигенов менингококка. Создание искусственных иммуногенов на основе синтетических пептидов, моделирующих функционально важные участки бактериальных белков, является одним из приоритетных направлений современной науки. Вакцины на основе таких искусственных иммуногенов вызывают иммунный ответ строгой направленности. Однако применение пептидных вакцин ограничено необходимостью их введения вместе с адьювантами. Конъюгация пептидов с капсульным полисахаридом менингококка позволяет отказаться от применения адьювантов. Результаты, полученные при изучении иммуногенности и протективности синтезированных пептидов, позволили начать поиск подходов к эффективному их представлению иммунной системе без дополнительного применения адьюванта с целью разработки вакцинного препарата. В результате конъюгации пептидных фрагментов поверхностных белков менингококка серогруппы В с капсульным полисахаридом менингококка серогруппы А были получены препараты, обладающие протективными свойствами как при заражении живой микробной культурой менингококка серогруппы А, так и серогруппы В.

В сыворотках мышей, иммунизированных конъюгатами, выявлялись антитела как к пептидному, так и к полисахаридному компонентам. Отобранные пептиды содержали Т-клеточные эпитопы, и, следовательно, пептид-полисахаридные конъюгаты должны индуцировать Т-зависимый ответ на полисахаридный компонент, что будет способствовать формированию долгосрочной иммунологической памяти.

Т.о. конъюгация пептидных фрагментов белков наружной мембраны менингококка серогруппы В с капсульным полисахаридом менингококка серогруппы А привела к созданию препаратов, обладающих выра-

женной протективностью в отношении менингококков обеих серогрупп, без использования адьюванта. Полученные экспериментальные данные показывают возможность создания поливалентной вакцины широкого спектра действия против менингококковой инфекции.

ДИНАМИКА ПРОДУКЦИИ TNF α И NO ПЕРИТОНЕАЛЬНЫМИ МАКРОФАГАМИ ПРИ ВОЗДЕЙСТВИИ РАЗНЫХ ШТАММОВ ВИРУСА КЛЕЩЕВОГО ЭНЦЕФАЛИТА

Крылова Н.В., Леонова Г.Н., Плехова Н.Г.

НИИ эпидемиологии и микробиологии СО РАМН,
г. Владивосток, Россия

В последние годы активно изучается роль макрофагов и их противовирусная активность в патогенезе флавивирусных инфекций, в том числе и клещевого энцефалита (КЭ) – тяжелой нейровирусной инфекции. Макрофаги отвечают на внедрение вирусов ранней секрецией целого ряда цитокинов, которые играют важную роль в первой линии противовирусной защиты. Одним из главных провоспалительных цитокинов, продуцируемых макрофагами, является TNF α , который, в свою очередь, как аутокринный регулятор, индуцирует синтез оксида азота (NO). Известно, что TNF α и NO играют существенную роль в инвазии, репликации вирусов и в поддержании латентного состояния внутриклеточных инфекций [Peter G.V. et al., 2000, Baskin H. et al., 1997]. Они могут действовать как агенты, которые, с одной стороны, вызывают гибель патогенов и (или) индуцируют апоптотические процессы в клетках-хозяевах, а с другой – участвуют в подавлении иммунных реакций.

Целью работы явилось изучение влияния разных штаммов вируса клещевого энцефалита (ВКЭ) на продукцию TNF α и NO перитонеальными макрофагами мышей.

Материалы и методы. В качестве клеточной модели были изучены мышинные перитонеальные макрофаги, инфицированные штаммами ВКЭ, выделенными от больных разными клиническими формами заболевания: штамм Р-73 (титр – 6 lg ТЦД₅₀) – из мозга умершего больного очаговой формой КЭ, и штамм Р-69 (титр – 5 lg ТЦД₅₀) – из крови пациента с инаппарантной формой КЭ. Макрофаги были инфицированы штаммами ВКЭ в дозе 2 lg ТЦД₅₀/5 x 10⁶ клеток и инкубированы в течение 1 ч при 37°C. Для изучения накопления вируса и продукции TNF α и NO супернатанты и монослой клеток отбирали в динамике наблюдения (1, 6, 9 ч и 1, 2, 3, 5 сут). Титры ВКЭ в супернатантах и монослое клеток определяли на культуре клеток СПЭВ. Продукцию цитокина TNF α макрофагами определяли в динамике в супернатантах методом ELISA Set с использованием тест-системы BD OptEIA™ Set Mouse TNF (BD Bioscience, USA) в соответствии с прилагаемой к набору инструкцией. Содержание метаболитов оксида азота (NO) – нитритов (NO-2) – определяли в монослое клеток с использованием Грисс-реактива.

Результаты. При исследовании накопления вируса КЭ в среде культивирования макрофагов, инфицированных штаммами Р-73 и Р-69 ВКЭ, обнаружено, что их титры одинаково увеличивались в динамике от 0 до 2,0 lg ТЦД₅₀ на 2-е сутки после инфицирования. В последующие сроки

наблюдения выявлены различия в процессах репликации этих штаммов. Титр штамма Р-73 оставался таким же высоким на 3-и сутки, к 5-м суткам клетки были полностью разрушены, и вирус в среде культивирования не обнаруживался. В то же время титр штамма Р-69 к 3-м суткам снижался до 1,0 lg ТЦД₅₀ и оставался таковым до 5 сут. При этом жизнеспособность макрофагов сохранялась, что косвенно указывало на отсутствие цитотоксичности, индуцированной этим штаммом ВКЭ.

Уже на ранних стадиях инфицирования макрофагов нами были выявлены различия в продукции провоспалительного цитокина TNF α и оксида азота клетками, инфицированными этими штаммами ВКЭ. Через 9 ч после инфицирования макрофагов штаммом Р-73 ВКЭ концентрация TNF α в среде культивирования увеличилась в 1,8 раза (62,2±7,3 пг/мл и 34,3±3,4 пг/мл, p = 0,025), а внутриклеточное содержание метаболитов NO повысилось до 23,4±2,8% по сравнению с неинфицированными макрофагами. В эти же сроки наблюдения в супернатантах клеток, инфицированных штаммом Р-69 ВКЭ, концентрация TNF α в 3,4 раза (115,7±13,7 пг/мл и 34,3±3,4 пг/мл, p = 0,004) превышала таковую в неинфицированных клетках, внутриклеточное содержание метаболитов NO достигало максимального значения – 81,5±4,3%.

На 2-е сутки наблюдения, когда в культуре клеток отмечалось максимальное накопление обоих штаммов ВКЭ, продукция TNF α и NO в макрофагах, инфицированных штаммом Р-73, также достигла максимального уровня. Концентрация TNF α увеличилась в 7,8 раз (312,0±32,7 пг/мл и 39,9±4,2 пг/мл, p = 0,001), содержание метаболитов NO повысилось на 53,4±3,2% по сравнению с неинфицированными клетками. На 3-и и 5-е сутки наблюдения отмечалось резкое снижение этих показателей. Инфицирование макрофагов штаммом Р-69 ВКЭ в тот же срок наблюдения выявило увеличение продукции цитокина TNF α в 4,1 раза (162,9±18,3 пг/мл и 39,9±4,2 пг/мл, p = 0,003), метаболитов оксида азота на 48,7±3,8% по сравнению с неинфицированными клетками. При дальнейшем наблюдении эти показатели незначительно снижались.

Заключение. Проведенные исследования позволили установить, что штаммы ВКЭ, выделенные от больных разными клиническими формами заболевания, неодинаково индуцируют синтез провоспалительного цитокина TNF α и оксида азота в инфицированных макрофагах. Штамм Р-73, выделенный от больного очаговой формой КЭ, на ранних стадиях инфицирования макрофагов индуцирует невысокий уровень продукции TNF α и NO, которого, как оказалось, недостаточно для предотвращения репликации вируса в макрофагах на этой стадии. Значительное увеличение на 2-е сут продукции TNF α и NO, вероятно, явилось одной из причин разрушения инфицированных макрофагов и снижения титра вируса в последующие сроки наблюдения. Штамм Р-69, выделенный от человека с инаппарантной формой КЭ, на ранних стадиях инфицирования индуцировал высокий уровень продукции TNF α и NO, что, однако, не предотвращало накопления вируса в культуре клеток. В поздние сроки наблюдения (3-и и 5-е сут) образовался баланс: на фоне невысоких титров вируса макрофаги продуцировали небольшое количество TNF α и NO, что, вероятно, указывало на возможность формирования персистенции вируса.

Полученные данные позволили предположить, что штаммы ВКЭ могут распространяться в различных тка-

ных организма не только клетками крови, но и макрофагами, которые являются удобной клеточной моделью для изучения репликации разных по вирулентности штаммов ВКЭ и противовирусной активности клеток.

СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ЦИРКУЛИРУЮЩИХ ФАГОЦИТОВ ИГЛОКОЖИХ

Кудрявцев И.В., Дьячков И.С., Могиленко Д.А., Сухачев А.Н., Полевщиков А.В.

НИИ экспериментальной медицины РАМН, Санкт-Петербург, Россия

Иглокожие, обладающие родством с предками хордовых животных, представляют важнейшую группу организмов, в которой можно наблюдать как наличие сложных механизмов врожденного иммунитета, так и первые признаки реакций приобретенного иммунитета. Клеточные реакции врожденного иммунитета опосредуются циркулирующими клетками целомической жидкости (целомоцитами, фагоциты), основными функциями которых являются распознавание патогена, его фагоцитоз, участие в реакциях инкапсуляции и тромбообразования. Однако до настоящего времени не исследована роль и функции отдельных клеточных популяций, равно как и не установлено их точное число, что и составило цель данного исследования.

Для получения отдельных фракций целомоцитов морской звезды *Asterias rubens* использовали метод градиентного центрифугирования. Градиент формировали путем последовательного наложения растворов диатризоата натрия с концентрациями 10%, 12,5%, 15% 20% на искусственной морской воде. Оценку поглощения меченых модельных антигенов (меченые ФИТЦ бактерии *E. coli* и *St. aureus*, частицы зимозана) целомоцитами проводили по методу Coteur et al., 2002 и Esteban et al., 1998. Образцы анализировали на проточном цитометре COULTER EPICS ALTRA (Beckman Coulter, Inc., USA). Разработка и адаптация к новому объекту метода автоматизированного учета спонтанного и индуцированного поглощения нейтрального красного была произведена на основе работ Bogenfreund, Puerner (1984) и Hauton, Smith (2004). Для изучения гемолитической активности фракций циркулирующих клеток *A. rubens* был использован метод безгелевой модификации реакции локального гемолиза по Н.К. Эрне. При оценке кислородного метаболизма целомоцитов базовой методикой служил автоматизированный НСТ-тест в спонтанной и индуцированной модификациях. Для амплификации кДНК гена, кодирующего гомолог С3, проводили ПЦР с специфическими праймерами, к клонированному ранее фрагменту гена ArC3-like морской звезды *A. rubens* (ARC3-like, GenBank DQ782738).

В ходе центрифугирования целомоцитов морской звезды в ступенчатом градиенте плотности диатризоата натрия стало получение трех фракций целомоцитов. Доминирующим типом первой фракции клеток были малые амебоциты, во второй фракции преобладали амебоциты с небольшими гранулами, равномерно распределенными по цитоплазме, а в третьей — амебоциты с около ядерной локализацией крупных гранул. Исследование фагоцитарной активности показало, что клетками всех фракций грамотрицательные бактерии

(*E. coli*) поглощались достоверно интенсивнее, чем грамположительные (*St. aureus*). Для фракции 1 эти значения составили $37,01 \pm 0,01\%$ и $28,41 \pm 0,79\%$ ($p < 0,01$), для фракции 2 — $47,91 \pm 1,42\%$ и $39,71 \pm 1,78\%$ ($p < 0,01$), а для третьей фракции — $36,08 \pm 2,82\%$ и $23,43 \pm 3,17\%$ ($p < 0,001$) соответственно. При исследовании способности клеток к генерации АФК показано, что спонтанная продукция достоверно не различалась между фракциями ($0,233-0,246$ ед.ОП/3 $\times 10^5$ клеток). Внесение в культуры 0,2% суспензии зимозана приводило к достоверному увеличению в 2,2-2,4 раза этого показателя во всех клеточных фракциях, достоверные различия были зарегистрированы между фракциями 1 и 2. Спонтанное накопление нейтрального красного в лизосомах и цитоплазме целомоцитов возрастало от фракции 1 к фракции 3, аналогичная тенденция сохранялась при внесении в лунки планшета стимулятора. Исследования гемолитической активности показало, что способностью к лизису ЭЧ обладают все полученные фракции клеток, но данная активность была более выражена у фракции 3, обогащенной гранулярными клетками. В ходе молекулярно-биологических исследований было показано, что мРНК гомолога С3 компонента комплекса обнаруживается во всех фракциях целомоцитов. При полуколичественной оценке уровня мРНК данного белка ее максимальная концентрация обнаруживалась в третьей фракции целомоцитов.

Исследование функций различных фракций циркулирующих клеток морских звезд *A. rubens* показало, что различия между фракциями составляют не более 15-25% по результатам большинства функциональных тестов. Полученные данные позволяют предполагать наличие у морских звезд одного типа полифункциональных циркулирующих клеток, которые, по-видимому, находятся на разных стадиях дифференцировки, что находит подтверждение в литературе.

Работа поддержана грантом РФФИ № 07-04-00084.

ГЕНЕРАЦИЯ РЕГУЛЯТОРНЫХ Т-КЛЕТОК *IN VITRO*

Курганова Е.В., Шевела Е.Я., Останин А.А., Черных Е.Р.

ГУ НИИ клинической иммунологии СО РАМН, г. Новосибирск, Россия

Введение. В последние годы регуляторные Т-клетки (Трег) привлекают все большее внимание исследователей. Показано, что развитие аутоиммунных заболеваний (рассеянного склероза, ревматоидного артрита, сахарного диабета 1 типа) и аллергопатологии у человека ассоциировано со снижением количества и/или функциональной активности Трег. С другой стороны, введение Трег экспериментальным животным с моделями аутоиммунных заболеваний приводит к реверсии или предотвращению развития аутоиммунного процесса, что обосновывает перспективу использования регуляторных Т-клеток в лечении целого ряда заболеваний. Основной проблемой при этом остается получение регуляторных Т-клеток *in vitro*.

Цель и задачи. Целью настоящей работы стало сравнительное исследование двух экспериментальных подходов (моделей) генерации Трег *in vitro*. Учитывая, что регуляторные Т-клетки характеризуются низким проли-

феративным потенциалом и наличием супрессорной активности, задачей исследования явилось также изучение указанных свойств генерируемых клеток.

Материалы и методы. В качестве источника для получения Treg использовали МНК периферической крови здоровых доноров. Первая модель включала культивирование МНК крови доноров в присутствии анти-CD3 антител (анти-CD3), интерлейкина-2 (IL-2, «Ронколейкин®»), витамина Д3 и дексаметазона. Во второй модели МНК культивировали в присутствии мезенхимальных стволовых клеток (МСК) костного мозга (в соотношении 10:1), анти-CD3 и IL-2. Функциональную активность генерируемых клеток оценивали по уровню их пролиферативного ответа в анти-CD3-стимулированных культурах и способности подавлять анти-CD3-индуцированный пролиферативный ответ аутологичных Т-клеток.

Результаты исследования. Полученные в первой модели клетки характеризовались отсутствием пролиферативного ответа на стимуляцию анти-CD3 (656 ± 475 имп./мин, $n = 6$). Супрессорная активность генерируемых клеток составила $21 \pm 6\%$ ($n = 9$) при их добавлении в культуры МНК в соотношении 1:10 и $41 \pm 9\%$ ($n = 10$) в соотношении с МНК, равном 1:2. При втором способе генерации Treg в присутствии МСК полученные клетки также практически не отвечали на стимуляцию анти-CD3 антителами (1807 ± 842 имп./мин, $n = 6$). Однако супрессорная активность полученных клеток была ниже, поскольку проявлялась только при соотношении 1:1 (36%, $n = 3$). Генерация Treg в обеих моделях сопровождалась увеличением доли $CD4^+CD25^+T$ -клеток, однако значимого прироста $CD4^+CD25^{high}$ не наблюдалось. Кроме того, культуральные супернатанты генерируемых клеток также обладали супрессорной активностью, что, вероятно, свидетельствует о преимущественной генерации индуцибельных регуляторных Т-клеток.

Заключение. Полученные данные свидетельствуют о потенциальной возможности генерации *in vitro* регуляторных супрессорных клеток, схожих по своим функциональным свойствам с индуцибельными регуляторными $CD4^+T$ -клетками. При этом Treg, генерируемые в присутствии анти-CD3-антител, IL-2, витамина Д3 и дексаметазона, характеризуются более выраженной супрессорной активностью, чем Treg, полученные в результате сокультивирования с мезенхимальными стволовыми клетками, анти-CD3 и IL-2.

ВЛИЯНИЕ АКТИВАЦИИ ОПИАТНЫХ РЕЦЕПТОРОВ НЕЙТРОФИЛЬНЫХ ЛЕЙКОЦИТОВ НА ИХ ФУНКЦИОНАЛЬНО-МЕТАБОЛИЧЕСКУЮ АКТИВНОСТЬ

Курзанов А.Н., Славинский А.А., Титов М.И., Балачевский Б.В.

Кубанский государственный медицинский университет, г. Краснодар, Россия

Введение. Существующие представления о взаимосвязи иммунной и нейроэндокринной системы и системы нейтрофильных лейкоцитов отражают эволюционную непрерывность регуляторных и защитных механизмов организма. Опиоидные пептиды обладают иммуномодулирующей способностью и могут влиять на фагоцитар-

ную функцию нейтрофилов, макрофагов, а также клеточные цитотоксические реакции.

Цель и задачи. Цель настоящей работы – исследование влияния аналога лей-энкефалина даларгина на функционально-метаболическую активность нейтрофильных лейкоцитов *in vitro* и зависимость эффектов от активации опиатных рецепторов на мембране лейкоцитов.

Материалы и методы. Исследованы нейтрофильные лейкоциты 42 проб периферической крови здоровых людей. Функциональную активность нейтрофилов оценивали с помощью НСТ-теста, который отражает активность НАДФН-оксидазы и количество активированных клеток, а также цитохимической реакции с амидо черным 10 Б на выявление содержания катионных белков. Кровь инкубировали с раствором даларгина в соотношении 1:1 в диапазоне концентраций от 1×10^{-4} М до 1×10^{-14} М в течение 60 минут при 37°C . Исследовано влияние времени инкубации крови с пептидом в дозе 1×10^{-7} М в течение от 5 до 120 минут. В части опытов кровь до инкубации с раствором даларгина прединкубировали с раствором налоксона в дозе 2×10^{-6} М в течение 5 минут. В контроле раствор даларгина замещали аликвотой физиологического раствора.

Основные результаты. Воздействие пептида в диапазоне концентраций от 1×10^{-4} М до 1×10^{-7} М способствовало постепенному увеличению процента активированных нейтрофилов и активности НАДФН-оксидазы. При использовании даларгина в концентрации 10^{-7} М процент активированных нейтрофилов превысил в 4,26 раза показатель контроля ($p < 0,01$). Активность НАДФН-оксидазы увеличилась в 1,62 раза ($p < 0,01$) и инкубация крови с раствором пептида в более низких концентрациях (1×10^{-8} М и 1×10^{-9} М) вызвала снижение способности нейтрофилов к активации. Для определения оптимального времени воздействия даларгина на активность нейтрофильных лейкоцитов нами выполнена инкубация периферической крови с раствором пептида в раннее установленной эффективно действующей концентрации – 1×10^{-7} М.

При инкубации крови с даларгином в диапазоне времени от 5 до 60 минут наблюдалось постепенное увеличение способности нейтрофильных лейкоцитов к активации. Это проявлялось повышением процента активированных нейтрофилов и активности НАДФН-оксидазы. Максимальные показатели активности нейтрофилов были получены через 60 минут от начала инкубации. Активность НАДФН-оксидазы увеличилась в 1,62 раза ($p < 0,01$) по сравнению с результатами, полученными в контрольном исследовании. При более длительной инкубации крови с пептидом наблюдалось незначительное снижение способности нейтрофильных лейкоцитов к активации и выраженности реакции восстановления НСТ.

Инкубация нейтрофилов с раствором даларгина не привела к статистически достоверным изменениям содержания в них катионных белков.

Прединкубация крови с налоксоном блокировала действие даларгина на опиатные рецепторы нейтрофилов, в результате чего процент активированных нейтрофилов снизился в 2,8 раза ($p < 0,05$), а активность НАДФН-оксидазы в 1,5 раза ($p < 0,05$) по сравнению со значениями, полученными только при применении даларгина в дозе 1×10^{-7} М.

Заключение. Полученные данные свидетельствуют об активации нейтрофильных лейкоцитов опиоидным

пептидом даларгином. Отсутствие изменения уровня катионных белков позволяет заключить, что даларгин не оказывает влияния на кислороднезависимый метаболизм нейтрофилов. Активирующий эффект даларгина на нейтрофильные лейкоциты имеет дозозависимый характер. Стимулирующий эффект даларгина на нейтрофилы *in vitro* отменялся блокированием опиоидных рецепторов налоксоном. Таким образом, взаимодействие даларгина с опиатными рецепторами нейтрофильных лейкоцитов *in vitro* активирует кислородзависимые антибактериальные системы и не оказывает воздействия на кислороднезависимые.

ПЕРЕКИСНОЕ ОКИСЛЕНИЕ БЕЛКОВ И ГИПОПЛАЗИЯ СЕЛЕЗЕНКИ ПРИ ИММОБИЛИЗАЦИОННОМ СТРЕССЕ

Лавин Е.А., Цейликман В.Э., Крупицкая Л.И., Сеницкий А.И., Романов Д.А.

ГОУ ВПО Челябинская Государственная медицинская академия Росздрава, г. Челябинск, Россия

Ранее в нашей лаборатории было продемонстрировано стрессорное усиление иммунодепрессивного действия глюкокортикоидного препарата триамцинолона ацетонида на фоне усугубления гипоплазии селезенки [Волчегорский и соавт., 2005]. Механизм этого феномена остается неизвестным. Между тем, свободнорадикальное окисление считается ведущим фактором апоптоза иммунокомпетентных клеток.

Поэтому в дальнейших исследованиях мы изучали особенности свободнорадикального окисления селезенки в условиях редкочередующихся иммобилизаций. Исследования были выполнены на крысах линии Вистар. Животные были подвергнуты четырехкратному одночасовому иммобилизационному стрессу с промежутками между отдельными иммобилизациями в 72 ч. В селезенке контрольных и стрессированных крыс определяли содержание молекулярных продуктов перекисного окисления липидов [Волчегорский и соавт., 1989] и уровень перекисления белков по Е.Е. Дубининой (1995).

Установлено, что через 24 ч после завершения последнего стрессорного эпизода увеличилось содержание продуктов перекисного окисления белков на 70 процентов. При этом уровень ПОЛ не претерпел статистически значимых изменений.

Таким образом, перекисное окисление белков при определенных стрессорных воздействиях может быть ведущим звеном свободнорадикального окисления в селезенке.

ПОЛУЧЕНИЕ ОДНОЦЕПОЧЕЧНЫХ АНТИТЕЛ ПРОТИВ ВИРУСА КЛЕЩЕВОГО ЭНЦЕФАЛИТА

Леванов Л.Н., Матвеев Л.Э., Юн Т.Э., Тикунова Н.В.

Федеральное государственное учреждение науки Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, п. Кольцово, Новосибирская область, Россия

Введение. Возможность получения в клетках *E. coli* небольших фрагментов антител, сохраняющих антигенсвязывающие свойства

целой молекулы иммуноглобулина (Ig), значительно расширила применение рекомбинантных антител в медицине и научных исследованиях, от диагностики и терапии до протеомики. Одними из наиболее распространенных фрагментов антител, получаемых в клетках *E. coli*, являются так называемые одноцепочечные антитела. Одноцепочечные антитела – это небольшие полипептиды (около 26 kDa), способные распознавать антиген и образованные путем объединения вариабельных доменов тяжелой и легкой цепей иммуноглобулинов с помощью линкера, кодирующего короткий пептид. Рекомбинантные одноцепочечные антитела имеют ряд преимуществ над исходными мышинными моноклональными антителами (МКА), такие как меньшая иммуногенность для человека и возможность генетического манипулирования. Кроме этого, было показано, что одноцепочечные антитела могут осуществлять протекцию и нейтрализацию вирусных агентов.

В настоящее время единственным средством лечения и профилактики клещевого энцефалита (КЭ) является специфический человеческий гамма-глобулин, который выделяют из сыворотки вакцинированных людей. Недостатком данного препарата (по сравнению с рекомбинантными антителами) является его дефицит, высокая цена и риск заражения неидентифицированными вирусными инфекциями.

Цель данной работы заключалась в получении рекомбинантных одноцепочечных антител против поверхностного гликопротеина Е вируса КЭ и оценке их иммунологических свойств.

Материалы и методы. Бактериальные штаммы: *Escherichia coli* DH5 α (F⁻, ϕ 80dlacZ Δ M15, recA1, endA1, gyrA96, thi-1, hsdR17(r_k⁻, m_k⁺), supE44, relA1, deoR) Δ (lacZYA-argF)U169 для клонирования генов иммуноглобулинов и *E. coli* BL21(DE3) (F⁻, ompT, hsd S_b(r_b⁻, m_b⁻), gal dcm (DE3) – для экспрессии одноцепочечных антител.

Реактивы: эндонуклеазы рестрикции, ДНК-полимераза, ДНК-лигаза фага T4, дезоксинуклеотидтрифосфаты, изопропил- β (D)-тиогалактопиранозид (IPTG), синтетические олигонуклеотиды производства ГНЦ ВБ «Вектор», компоненты питательных сред.

Методы: выделение РНК, синтез кДНК, ПЦР, рестрикция, электрофорез в ПААГ, реакция лигирования, трансформация, иммуноблоттинг, ИФА.

Результаты и обсуждение. Для получения одноцепочечных антител в качестве источника генетического материала были использованы гибридомы 10C2 и 14D2. Эти гибридомы продуцируют моноклональные антитела (МКА) против поверхностного гликопротеина Е вируса клещевого энцефалита, и эти МКА также демонстрируют активность в реакции биологической нейтрализации.

Фрагменты ДНК, кодирующие вариабельные домены тяжелых и легких (каппа) цепей гибридом 10C2 и 14D2, были получены в ПЦР и объединены с помощью ДНК-линкера, кодирующего пептид (Gly4Ser)₃, в виде одноцепочечного ДНК-фрагмента. Полученные фрагменты ДНК были встроены в плазмиду pTLS под транскрипционный контрольный промотор бактериофага T7, что привело к получению двух рекомбинантных плазмид pTLS-10C2 и pTLS-14D2.

Клетки *E. coli* BL21(DE3), трансформированные рекомбинантными плазмидами, индуцировали IPTG и культивировали в течение ночи. Электрофоретический анализ клеточных лизатов показал наличие в индуцированных клетках дополнительного белка с мол. весом около 26 kDa. Это соответствует расчетному молекулярному

весу одноцепочечных антител. Следует отметить, что антителовые антитела в иммуноблоттинге лизатов клеток, содержащих плазмиды рТLS-10С2 и рТLS-14D2, взаимодействовали с вновь синтезированными белками.

Одноцепочечные антитела также были протестированы на специфичность связывания с вирусом клещевого энцефалита (штамм 205) и с рекомбинантным белком Е вируса КЭ. Они продемонстрировали связывающую активность эквивалентную исходным МКА.

Заключение. Поскольку полученные одноцепочечные антитела, как и исходные МКА, взаимодействуют с вирусом КЭ, а исходные МКА способны нейтрализовать вирус на модельных животных, мы предполагаем, что одноцепочечные антитела также смогут нейтрализовать вирус КЭ. В случае наличия протективной активности, сконструированные одноцепочечные антитела, могли бы стать ценными реагентами для разработки специфических препаратов против вируса клещевого энцефалита.

ИММУНОРЕГУЛЯТОРНЫЕ СВОЙСТВА ПЕРОРАЛЬНОГО ПРИМЕНЕНИЯ ТРАНСГЕННОЙ МОРКОВИ *DAUCUS CAROTA L.*, НЕСУЩЕЙ ГЕН ИЛ-18 ЧЕЛОВЕКА

Лопатникова Ю.А.¹, Якушенко Е.В.¹, Храпов Е.А.², Дейнеко Е.В.³, Воронина Е.Н.², Филипенко М.Л.², Шумный В.К.³, Сенников С.В.¹, Козлов В.А.¹

¹ НИИ Клинической иммунологии СО РАМН, г. Новосибирск, Россия

² Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, г. Новосибирск, Россия

³ Институт цитологии и генетики СО РАН, г. Новосибирск, Россия

Перспективным направлением по наработке рекомбинантных белков является технология получения трансгенных растений в качестве биопродуцентов. Основные преимущества такого типа экспрессии – это относительно низкая стоимость получаемых препаратов и отсутствие загрязнения вирусами. В различных экспериментальных моделях показана эффективность перорального введения антигенов или цитокинов для модуляции иммунного ответа. ИЛ-18, используемый в данной работе, является одним из ключевых цитокинов, регулирующих функциональную активность Т-клеток и определяющих путь, по которому будет преимущественно развиваться иммунный ответ. Основные эффекты ИЛ-18 направлены на стимуляцию продукции таких цитокинов, как ИФН γ , ФНО α , ИЛ-1 β , а также молекул адгезии и факторов, стимулирующих апоптоз.

Цель работы: изучение иммунорегуляторных свойств трансгенного растения *Daucus carota L.*, несущего ген ИЛ-18 человека, при пероральном применении у мышей.

Материалы и методы. На базе Института цитологии и генетики СО РАН совместно с Новосибирским институтом химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН было получено трансгенное растение моркови – *Daucus carota L.* – продуцент ИЛ-18 человека. В ДНК растений была определена последовательность гена ИЛ-18 методом ПЦР, а в экстракте корнеплодов поколения Т3 белок методом иммуноблота. Изучение иммунорегуляторных эффектов ИЛ-18, экспрессирующегося в трансгенной мор-

кови, проводилось на мышах гибридах СBF1 (С57В16хСВА) животные получали к стандартному рациону в течении 16 дней морковь в дозе 1,7-2 г/мышь ежедневно. В качестве контроля использовалась группа мышей, получавшая обычную морковь в той же дозе, а также интактная группа мышей, содержащаяся на стандартном рационе без добавок. Получение и культивирование спленоцитов, а также оценка клеточного иммунного ответа в форме выраженности реакции ГЗТ проводились стандартными методами. Количественное определение ИФН γ в супернатантах культур спленоцитов осуществлялось методом ЭХЛ на приборе ORIGEN ANALYZER (IGEN Inc., USA). Модель уретан-индуцированной аденокарциномы легких была индуцирована на мышах линии BALB/c 8-микратным внутривидным введением уретана (0,7 мг на 1 г веса).

Результаты. Установлено, что прием в пищу моркови трансгенной ИЛ-18 в течении 16 дней достоверно увеличивает КонА-стимулированную продукцию ИФН γ спленоцитами мышей, но не влияет на спонтанную и митоген-индуцированную пролиферативную активность спленоцитов. Также было показано стимулирующее влияние перорального введения трансгенной моркови на выраженность реакции ГЗТ у экспериментальных животных. При изучении противоопухолевых свойств трансгенного растения в модели уретан-индуцированной аденокарциномы легких было показано, что пероральное применение растения, несущего ген ИЛ-18 человека, приводит к достоверному уменьшению количества аденоматозных узлов в легких экспериментальных животных.

Заключение. Полученные данные свидетельствуют о том, что трансгенное растение *Daucus carota L.*, несущее ген ИЛ-18 человека, обладает биологической активностью и противоопухолевыми свойствами при пероральном применении.

Работа поддержана ФЦП «Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2007-2012 годы», госконтракт № 02.512.11.2019

ИНФОРМАЦИОННАЯ СТРУКТУРА ДЕСМОГЛЕИНА 3

Лысенко А., Некрасов А., Акопов С., Свищевская Е.

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

Введение. Вульгарная пузырчатка (ВП) является тяжелым аутоиммунным заболеванием, при котором наблюдается формирование пузырей в эпидермисе и на слизистых оболочках. Аутоантигеном при ВП является белок десмосом десмоглеин 3 (ДСГ3). Связывание аутоантител с ДСГ3 приводит к нарушению межклеточной адгезии, в результате чего на коже и слизистых образуются многочисленные эрозийные бляшки или пузыри. Белки ДСГ3 формируют плотный контакт между клетками кожи кератиноцитами за счет формирования гомодимеров. ДСГ3 состоит из 5 доменов, из которых первый дистальный домен формирует центр гомофильного связывания, а проксимальные домены являются структурными элементами молекулы. Известно, что в каждом домене имеются места для связывания двух молекул Са²⁺. Кроме того, показано, что аутоантитела от больных ВП распознают преимущественно 1-й дистальный домен. Нами

ранее был разработан новый метод анализа последовательностей белков, позволяющий охарактеризовать информационную структуру (IS) белков, выявить структуру доменов и функционально значимые участки. IS белков имеет иерархическую организацию и может быть представлена в виде деревьев, формирующихся участками с увеличенной степенью координации информации (IDIC) между аминокислотами (aa). Ранее было показано, что аномально плотные участки информации (ADD+-сайты) в нижнем уровне деревьев играют значительную роль в функционировании белков (центры ферментов; участки, содержащие В-эпитопы; участки, формирующие контакты между доменами белка).

Цель. Целью данной работы было составление IS ДСГЗ и идентификация положения ионов Ca^{2+} , а также локализация В-эпитопов, распознаваемых патогенными аутоантигенами от больных ВП.

Методы. IS анализ основан на особенностях распределения энтропии, выявленной при анализе баз данных по негомологичным белкам: зависимость энтропии информации от расстояния между aa имеет S-образную форму, что указывает на существование участков с различной степенью координации информации. Мы показали, что уровень координации на расстоянии 6 aa является постоянно высоким, что оказалось верным для всех белков. Это позволило рассматривать белок как структуру, состоящую из информационных единиц длиной 6 aa. Детальный алгоритм анализа IS белка описан в [1].

Результаты. Для белка ДСГЗ была построена IDIC-диаграмма, которая показала, что в состав именованного 1-го домена входит наибольшее количество ADD+-сайтов. Поскольку именно 1-й домен отвечает за межклеточную адгезию, то это соответствует ранее полученным нами данным о функциональной роли этих участков белков. Далее анализ IS показал, что все участки связывания Ca^{2+} в молекуле ДСГЗ также локализируются в ADD+-сайтах. Наконец, идентификация участка в IS структуре ДСГЗ на основе литературных данных по локализации В-эпитопов, распознаваемых аутоантигенами больных ВП, показала, что основные эпитопы расположены в участке с уникально большой для ДСГЗ плотностью ADD+-сайтов. Идентифицированный группой M. Amagai сайт связывания патогенных аутоантител состоял из 25 aa. Использование IS анализа позволило предположить, что эпитоп локализован только в 10 aa, соответствующих aa AIVDREETPS. Ранее нами было показано, что ADD+-сайты, содержащие положительно заряженные aa (R), с наибольшей вероятностью формируют В-клеточные эпитопы.

Выводы. Полученные данные позволили уточнить положение В-эпитопа, распознаваемого патогенными аутоантигенами, что, однако, требует экспериментальной проверки.

ДИФФЕРЕНЦИРОВКА Т-ЛИМФОЦИТОВ И РЕГУЛЯЦИЯ ВОСПАЛИТЕЛЬНЫХ РЕАКЦИЙ В ОЧАГЕ ИНФЕКЦИИ

Лядова И.В., Капина М.А., Шепелькова Г.С., Винслоу Г., Апт А.С.

ГУ ЦНИИ Туберкулеза РАМН, Москва, Россия;
Вадсворс Центр, Олбани, США

При внутриклеточных инфекциях протективный иммунный ответ определяется активностью Т-лимфоцитов

и эффективностью их взаимодействия с фагоцитарными клетками, в первую очередь, с макрофагами. Недостаточность одного из звеньев иммунного ответа приводит к развитию тяжелого инфекционного процесса. С другой стороны, гиперреактивность и неконтролируемое развитие воспалительных реакций может вызывать существенное повреждение тканей и системные нарушения. Исход инфицирования, особенно при хронических инфекциях, зависит от сбалансированности иммунного и воспалительного ответов. Считается, что инициация Т-клеточного ответа и формирование зрелых эффекторных Т-лимфоцитов происходит в дренирующих лимфатических узлах. В последние годы, однако, появляются данные о том, что окончательная дифференцировка Т-лимфоцитов происходит и за пределами лимфоидных органов — в так называемых «периферических» тканях. В докладе рассматриваются механизмы, обеспечивающие контроль Т-клеточного и воспалительного ответов в периферических органах и тканях, в частности, в легких.

Результаты получены на модели экспериментальной туберкулезной инфекции у мышей. Ранее нами было показано, что дифференцировка Т-лимфоцитов сопровождается переходом наивных лимфоцитов, имеющих фенотип $CD62L^{hi}CD27^{hi}$, в активированные, но функционально незрелые лимфоциты $CD62L^{lo}CD27^{hi}$, а затем — в полностью дифференцированные лимфоциты $CD62L^{lo}CD27^{lo}$. Исследования лимфоцитов, находящихся в лимфоидных органах, лимфоцитов, мигрирующих из лимфатических узлов в легочную ткань, и клеток персистирующих в легочной ткани, показали, что дифференцировка лимфоцитов $CD27^{hi}$ в лимфоциты $CD27^{lo}$ происходит непосредственно в легочной ткани. Снижение уровня экспрессии молекул CD27 сопровождается функциональным созреванием лимфоцитов и продукцией ими эффекторных цитокинов $IFN\gamma$, $TNF\alpha$, IL-17. Наряду с функциональной активностью снижение экспрессии молекул CD27 запускает механизмы Т-клеточного апоптоза, обеспечивая тем самым регуляцию пула периферических лимфоцитов и защищая ткани от повреждающего воздействия эффекторных цитокинов. Таким образом, молекулы CD27 принимают важное участие в регуляции активности и пула эффекторных Т-клеток в периферических органах и тканях. В связи с тем значением, которое имеет уровень экспрессии молекул CD27 в функционировании Т-лимфоцитов, важно понимание механизмов, регулирующих их экспрессию. Показано, что снижение экспрессии молекул CD27 запускается при стимуляции преактивированных лимфоцитов через Т-клеточный рецептор. Уровень экспрессии молекул CD27 также зависит от соотношения про- и противовоспалительных цитокинов в клеточном микроокружении. Последнее обеспечивает связь между развитием локальной воспалительной реакции и окончательной дифференцировкой Т-лимфоцитов в очаге инфекции.

При хронических инфекциях происходит постоянная стимуляция фагоцитов и Т-лимфоцитов патогеном (антигеном), вызывающая локальную продукцию медиаторов воспаления. Уровень продукции медиаторов воспаления фагоцитами во многом детерминирован генетически и существенно влияет на течение инфекционного процесса. Нами показано, что у генетически различных мышей, отличающихся по уровню экспрессии в легочной ткани иммунорегуляторных цитокинов, течение ту-

беркулезной инфекции приобретает разные формы. При высокой экспрессии в легких интерлейкинов IL-11, IL-6 и IL-1 β , обычно сочетающейся с высокой экспрессией хемокинов MIP-1 α , MIP-1 β и MIP-2, отмечается крайне тяжелое течение инфекционного процесса с быстрым развитием системной воспалительной реакции, кахексии и гибели животных. В легких у таких мышей отмечается увеличенное количество «незрелых» лимфоцитов CD27^{hi} ($p < 0,002$). Введение антител, специфичных к IL-11, приводит к уменьшению экспрессии в легочной ткани провоспалительных цитокинов и хемокинов, способствует накоплению «зрелых» лимфоцитов CD27^{lo}, снижает интенсивность инфильтративных изменений в легких и уменьшает выраженность кахексии.

Выводы. Таким образом, окончательная дифференцировка эффекторных клеток может происходить непосредственно в очаге инфекции. Эффективность этого этапа Т-клеточной дифференцировки регулируется уровнем локальной продукции иммунорегуляторных цитокинов, который, по-видимому, детерминирован генетически. Неконтролируемое образование провоспалительных цитокинов и хемокинов может приводить к иммунному истощению и значительному утяжелению течения инфекции.

ВЛИЯНИЕ VEGF НА ХЕМОТАКСИС И ТРАНСЭНДОТЕЛИАЛЬНУЮ МИГРАЦИЮ ТИМОЦИТОВ МЫШЕЙ

Лямина И.В., Старикова Э.А., Киселёва Е.П.

НИИ экспериментальной медицины РАМН, Санкт-Петербург, Россия

Фактор роста эндотелия сосудов (VEGF) является одним из основных ангиогенных факторов, играющих важную роль как в нормальном, так и патологическом процессе ангиогенеза. Кроме того, VEGF также обладает рядом иммунорегуляторных свойств. Ранее нами было показано, что в тимоцитах экспрессируется мРНК одного из рецепторов VEGF, а именно VEGFR2 [Киселёва Е.П. и др., 2005]. Однако функциональное значение этого рецептора изучено недостаточно.

Целью данного исследования было изучение влияния VEGF на хемотаксис и трансэндотелиальную миграцию тимоцитов интактных мышей.

Работа проводилась на самцах мышей линии DBA/2. Оценку влияния VEGF (PeproTech) на хемотаксис тимоцитов проводили с использованием поликарбонатных трансвеллов 24-луночного формата (Costar) с диаметром пор 5 мкм [по методу Kim et al., 1998]. Оценку трансмиграции клеток проводили с использованием трансвеллов (Becton Dickinson, США) с диаметром пор 8 мкм [по методу Reiss, Engelhardt, 1999]. Для проведения трансэндотелиальной миграции в верхние камеры трансвеллов вносили 150 мкл эндотелиальных клеток линии EA.hy 926 в полной культуральной среде DMEM/F12 («Sigma», США) в концентрации 5×10^5 /мл и инкубировали во влажной атмосфере с 5% CO₂ при 37°C в течение 24 ч до получения монослоя. В случае изучения хемотаксиса, и трансмиграции в верхние камеры трансвеллов вносили тимоциты по 3×10^6 в 100 мкл среды DMEM/F12, содержащей 1% FCS («ICN», США). В нижние камеры

добавляли по 600 мкл той же среды с различной концентрацией хемоаттрактантов. Планшеты инкубировали при 37°C в течение 4 ч. Количество мигрировавших клеток подсчитывали в камере Горяева и определяли индекс миграции как отношение числа мигрировавших клеток к внесенному числу клеток.

В качестве стандартного стимулятора хемотаксиса использовался SDF-1 α человека (R&D), в концентрации 400 нг/мл. SDF-1 α повышал миграцию тимоцитов в 3,5 раза по сравнению с контролем. VEGF также оказывал стимулирующее влияние на хемотаксис клеток в диапазоне доз: 1-100 нг/мл. Наиболее эффективной концентрацией VEGF была 50 нг/мл, при этом число мигрировавших клеток было в 1,5-2 раза больше по сравнению с контролем. В качестве стандартного стимулятора трансэндотелиальной миграции использовался ФНО α в концентрации 50 ед/мл. SDF-1 α не оказывал влияния на трансмиграцию тимоцитов. VEGF усиливал трансмиграцию, при этом наиболее эффективной концентрацией VEGF была 50 нг/мл, число мигрировавших клеток было в 1,5 раза больше по сравнению с контролем.

Таким образом, VEGF обладает хемотаксической активностью по отношению к тимоцитам и, возможно, играет важную роль в выходе тимоцитов из тимуса через вены с высоким эндотелием.

Работа поддержана грантом РФФИ № 06-04-48250.

«РАСПОЗНАВАНИЕ ОПАСНОСТИ ПОВРЕЖДЕНИЯ» КАК УНИВЕРСАЛЬНОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ ФУНКЦИЙ ИММУННОЙ СИСТЕМЫ

Ляшенко В.А.

ГУ НИИ вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова РАМН, Москва, Россия

Привычное для нас определение задачи иммунной системы как «различение своего и чужого» подразумевает две функции: ответ на чужеродное и исключение возможности ответа на «свое». В этом случае во главу угла ставится лимфоцит, распознающий соответствующие пептиды – антигенные детерминанты. В последние годы появилась новая гипотеза, предполагающая, что развитие иммунного ответа зависит от исходного повреждения, вызванного внешними или внутренними факторами – безразлично, и реализующегося на уровне антигенпрезентирующих клеток (АПК). Последние (макрофаги, дендритные клетки) приступают к интенсивному образованию цитокинов и интерлейкинов, без которого лимфоциты не могут быть вовлечены в дальнейшее развитие иммунного ответа, а могут подвергнуться апоптозу или включиться в состояние толерантности к «чужому». Последнее не подлежит сомнению, поскольку в организме постоянно находится большое количество микробов и вирусов – комменсалов. Если повреждение вызвано патогенными микроорганизмами, то возбуждение АПК обусловлено рецепторами так называемой «врожденной» системы иммунитета (toll-like и другими), а далее происходит включение Т-лимфоцитов «адаптивной системы», распознающими пептиды патогена, вовлекаемыми в структуры главного комплекса гистосовместимости (МНС) на поверхности АПК. Рецепторы «врожденной»

системы специфичны, главным образом, к характерным, широко распространенным структурным молекулам микроорганизмов. Сигналы, формируемые АПК для лимфоцитов, могут различаться по характеру, но не несут узкой антигенной специфичности. Последняя обеспечивается рецепторами Т-клеток, специфичными к презентуемому МНС «протективному» антигену. Достоверно выглядят с точки зрения «гипотезы повреждения» существование аутоиммунных реакций организма, которые все же являются не только болезнью, но и повседневным состоянием. Не подлежит сомнению наличие в сыворотке здорового человека определенного уровня аутоантител, что свидетельствует о наличии соответствующих клонов Т- и В- лимфоцитов. Известны некоторые типы Т- и В-лимфоцитов, как бы исходно предназначенные для распознавания «своего»; например, подгруппа В1 лимфоцитов, склонных к синтезу аутоантител. Разумеется, специфичные к «своим» белкам Т-лимфоциты, даже находящиеся в периферических лимфоидных органах, удерживаются от активного размножения, в частности, системой Т-регулирующих лимфоцитов, но повреждение – например, инфекционное воспаление поджелудочной железы – включает находящиеся в органе АПК на запуск аутоиммунных клонов лимфоцитов. Таким образом развиваются хорошо известные аутоиммунные заболевания. Впрочем, следует отметить, что образуемые аутоантитела не всегда могут быть расценены как причина заболевания, но часто – как свидетельство его развития, исчезающее по излечении. Накоплены также данные о том, что АПК могут быть активированы генетически обусловленными нарушениями жизненного цикла этих клеток – например, своевременного, регулируемого апоптоза. В этом случае также возможно вовлечение в иммунологический процесс лимфоцитов, обладающих рецептором аутоиммунной специфичности с последующим образованием аутоантител. В целом, гипотеза ответа на угрозу повреждения позволяет снять некоторые вопросы классической теории иммуногенеза, в частности – неясности в иммунологическом определении «своего» и «не своего». Практически она предлагает стимуляцию АПК в тех случаях, когда иммунный ответ заведомо слаб, например, при лечении злокачественных заболеваний. Она объясняет возможность аллогенной пересадки рогаковицы, содержащей очень немного АПК, но может также объяснить успешное преодоление хронической инфекции стимуляцией АПК микробными поливакцинами и, напротив, развитие толерантности в случае недостаточной активации АПК данным антигеном. В принципе, она предлагает еще раз обратиться к индукции иммунного ответа на самых ранних его стадиях, и в этом реальная ценность гипотезы.

СРАВНЕНИЕ ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ НЕЙТРОФИЛОВ ПРИ РОСТЕ ОПУХОЛИ *IN VIVO* НА ТРЕХ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ МОДЕЛЯХ

Мальцева В.Н., Сафронова В.Г.

Институт биофизики клетки Российской Академии Наук, г. Пущино, Россия

Введение. Иммунная система играет важную роль в задержке роста и регрессии опухолей. Большинство

злокачественных новообразований вызывает изменения характеристик компонентов иммунной реакции. Показано динамическое изменение функционирования нейтрофилов при развитии некоторых типов опухолей у человека и животных. Нарушения в системе регуляции интенсивности генерации АФК нейтрофилами, где одну из ведущих ролей играют киназы, остаются на данный момент малоизученными

Задача работы. Провести сравнительный анализ продукции АФК иммунными клетками мышей с инъекцией опухолевых клеток трех разных линий в динамике роста опухоли.

Материалы и методы. Работа проведена на периферической крови и перитонеальных вызванных нейтрофилах мышей инбредной линии BALB/c с экспериментальными сингенными опухолями, сформированными путем внутримышечной инокуляции клеток линий J774 (макрофагоподобные клетки), WEN164 (фибросаркома), NS0 (лимфобластома). Продукцию АФК определяли по люминол-зависимой хемилюминесценции. Респираторный взрыв активировали 0,25 мг/мл опсонизированным зимозаном (ОЗ) или хемотаксическим пептидом N-формил-Мет-Лей-Фен (ФМЛФ). Изолированные клетки инкубировали с ингибиторами киназ в течение 20 минут при 37°C, затем активировали 0,01-50 мкМ ФМЛФ.

Основные результаты. Обнаружено, что по мере развития опухолей уровень спонтанной продукции АФК клетками крови увеличивался и достигал максимума на 7 сутки после инокуляции опухолевых клеток. Ответ на ОЗ постепенно возрастал как в случае J774, так и в случае WEN164. У животных с опухолью, сформированной клетками NS0, наблюдалось резкое усиление продукции АФК клетками крови на 7 сутки, а затем спад продукции АФК, что свидетельствует, вероятнее всего, о развитии и завершении воспалительной реакции. На всех трех моделях наблюдалось динамическое увеличение количества привлеченных в перитонеальную полость нейтрофилов и увеличение их размера. Изменение спонтанного уровня оксидантной активности в изолированных нейтрофилах и респираторного взрыва вызванного ФМЛФ в концентрациях 0,01-50 мкМ, имело особенности в экспериментальных группах с разными опухолями: J774 – подавление интенсивности на ранних этапах (3-7 день) и усиление на более поздних (26 день); WEN164 и NS0 – усиление интенсивности, начиная с 7 суток. Было выявлено изменение роли p38 митоген-активированной протеинкиназы (МАРК) и фосфатидилинозит 3-киназы (PI3K) в регуляции спонтанного уровня генерации АФК и интенсивности респираторного взрыва в зависимости от продолжительности роста опухоли. В обоих случаях оно имело двухфазный характер: подавление активности на ранних этапах (7 дней) и усиление на более поздних (13-15 дней) во всех экспериментальных группах.

Заключение. Изменение уровня спонтанной и активированной ОЗ продукции АФК клетками крови, параметров воспалительной реакции (количество нейтрофилов, размер) имеет общие закономерности при развитии всех исследуемых опухолей. В то время как динамика изменения продукции АФК изолированными нейтрофилами имеет характерные особенности в зависимости от типа опухоли. Роль p38 МАРК и PI3K

в регуляции оксидазной активности меняется в зависимости от продолжительности роста опухоли.

ПОЛУЧЕНИЕ СТАБИЛЬНЫХ КОНФОРМЕРОВ МОНОКЛОНАЛЬНЫХ АНТИТЕЛ К ФЕРРИТИНУ ЧЕЛОВЕКА С УВЕЛИЧЕННОЙ АНТИГЕНСВЯЗЫВАЮЩЕЙ СПОСОБНОСТЬЮ ПОСЛЕ ИНКУБАЦИИ С ДИМЕТИЛФОРМАМИДОМ

Мельникова Я.И.

Международный государственный экологический университет им. А.Д. Сахарова, г. Минск, Беларусь

Институт биоорганической химии НАН Беларуси, Беларусь

Эффекты модификации структуры белков с помощью химических агентов или физических факторов, как правило, представляют собой частичную или полную потерю биологической активности. Большая часть результатов по функциональной активации белков достигнута с помощью методов генной инженерии. Большинство методов химической модификации белков требует добавок органических растворителей вследствие гидрофобной природы многих химических модифицирующих агентов.

В работе исследованы эффекты относительно низких концентраций диметилформамида (ДМФА) на связывание ферритина антителами субкласса IgG2a мыши. В использованных концентрациях ДМФА не вызывал глобальных изменений конформации белка, но приводил к формированию стабильных конформеров антител с увеличенной функциональной активностью.

Материалы и методы. Моноклональные антитела G10 и F11 (субкласс IgG2a) к ферритину селезенки человека и их конъюгаты с биотином и ферритин получены и охарактеризованы как описано ранее. Антитела инкубировали с ДМФА в концентрациях от 3 до 40%, в 0,1 М Na-боратном буфере, pH 8,5. ДМФА удаляли гель-фильтрацией на Sephadex G200. Константы взаимодействия антитела G10 с ферритином определяли по методу Хогга и соавт. с помощью разработанной математической модели. Спектры собственной флуоресценции антител регистрировали на спектрофлуориметре SFL-1211 («Solar», Беларусь), при 22° и 60°С. Для построения кривых денатурации использовали стандартную методику.

Основные результаты. Было обнаружено, что инкубация антитела G10 с 11%-ным ДМФА увеличивает аффинность антител к иммобилизованному антигену в 1,6 раза и эффект сохраняется при концентрациях ДМФА 25 и 40%. Для растворимой формы антигена активация в 2,5 раза проявляется при концентрации ДМФА 11% и возрастает до 3,7-кратной после инкубации с 40%-ным ДМФА. Аффинность антитела F11 после инкубации с ДМФА увеличивается в 2,6-5,6 раза с максимумом активирующего эффекта при концентрации ДМФА 5%. Для антитела F11 максимальный активирующий эффект наблюдался течение первых 15 минут инкубации с 5%-ным ДМФА. Для антитела G10 – после 1 часа инкубации с 25%-ным ДМФА. При отсутствии выраженных изменений третичной структуры антител F11 и G10 в низких (до 10%) концентрациях ДМФА зарегистрировано небольшое снижение стабильности третичной структуры в 10%-ном ДМФА в условиях денатурант-зависимых переходов ан-

тител из нативного в развернутое состояние. Концентрация денатуранта, соответствующая точке полуперехода как исходных, так и модифицированных антител, варьировала в диапазоне от 2 до 3 М гуанидингидрохлорида, но для нативных антител эта концентрация во всех случаях оказалась выше на небольшую, но достоверно регистрируемую величину – 0,3-0,5 М.

Заключение. Показано, что инкубация двух моноклональных антител субкласса IgG2a мыши с ДМФА приводит к их значительной функциональной активации. Степень активации зависит от концентрации ДМФА и в меньшей степени – от аффинности антител. Установлено, что для конформационных перестроек под действием ДМФА достаточно 15-60 минут. Данные функционального анализа позволяют заключить, что инкубация с ДМФА антител G10 и F11 приводит к необратимым конформационным изменениям молекулы антител и формированию конформеров, длительно стабильных после удаления органического растворителя, которые обладают повышенным сродством к антигену. Конформационные изменения происходят при достаточно низких концентрациях ДМФА (5-8%). Наиболее вероятно, что в этот процесс вовлечены гипервариабельные петли (CDR loops) антигенсвязывающих участков в VL- и VH-доменах и в полученных активированных конформерах при неизменной глобальной третичной структуре доменов и доменных блоков происходит некоторое ослабление локальных третичных взаимодействий.

ПЕРСПЕКТИВЫ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ИНФЕКЦИОННО-ТОКСИЧЕСКОЙ МОДЕЛИ ЧУМНОЙ ИНФЕКЦИИ НА МЫШАХ ДЛЯ ОЦЕНКИ ЭФФЕКТИВНОСТИ АНТИБАКТЕРИАЛЬНЫХ И ВАКЦИННЫХ ПРЕПАРАТОВ

Мишанькин М.Б., Рыжко И.В., Тынянова В.И., Цураева Р.И., Васильева Г.И.

ФГУЗ научно-исследовательский противочумный институт институт, г. Ростов-на-Дону, Россия

Введение. До настоящего времени экспериментальная оценка эффективности антибактериальных и вакцинных препаратов проводится на модели чумы у лабораторных животных, инфицированных суспензиями микробных клеток в изотоническом растворе хлорида натрия. Однако, такая модель не дает представления об эффективности применения антибиотиков на стадии развивающегося инфекционно-токсического шока (ИТШ) и о способности вакцинных препаратов формировать антитоксический иммунитет. Ранее показано [Тынянова В.И. и др., 1993], что гликолипид, присутствующий в эритроцитах и паренхиматозных органах млекопитающих, активирует токсические субстанции («мышинный» токсин – МТ; липополисахарид – ЛПС) возбудителя чумы и при этом образуется комплекс МТ-ЛПС, обладающий высокой токсичностью для белых мышей и морских свинок. При этом МТ является не только регулятором токсической активности ЛПС [Соколова Е.И., 2002], но и суперантигеном [Мишанькин М.Б. с соавт., 1997]. Эти работы до сих пор не носили прикладного характера.

Цель и задачи исследования: оценка перспектив использования инфекционно-токсической модели чумы на мышах (высоковирулентные заражающие штаммы) для отбора средств этиотропной терапии чумы, эффек-

тивных при развивающемся ИТШ, и контроля формирования антитоксического иммунитета.

Материалы и методы. Использовали вирулентный штамм *Yersinia pestis* 231 и вторую генерацию вакцины чумной живой сухой EV НИИЭГ; антибиотики — стрептомицин и гентамицин отечественного производства; гемолизированные эритроциты человека готовили по описанной ранее [Кравцов А.Н. с соавт., 1993] методике. Суспензии микробных клеток из суточной агаровой культуры штамма 231 готовили одновременно в изотоническом растворе хлорида натрия и в гемолизатах эритроцитов. Беспородных белых мышей массой 18-20 г заражали подкожно. Одновременно на двух моделях инфекции определяли значения ED_{50} гентамицина и стрептомицина. Оценку формирования противочумного иммунитета проводили по значениям LD_{50} культур в изотоническом растворе хлорида натрия и в гемолизатах эритроцитов человека на иммунизированном (10^6 м.к. штамма EV) поголовье мышей.

Основные результаты. В шести независимых экспериментах значения LD_{50} штамма чумного микроба 231 без активации гемолизатом эритроцитов оказались достоверно ($p < 0,1$), выше, чем после активации, которая приводила к максимальному выражению вирулентности ($LD_{50} = 1-3$ КОЕ). Активированная культура вызывала инфекционный процесс у мышей более скоротечный ($p < 0,1$), чем та же культура без активации. Вторая генерация вакцины EV (10^6 м.к.) формировала напряженный специфический иммунитет у мышей против инфицирования традиционно приготовленной суспензией микробных клеток штамма 231 ($LD_{50} = 10^6$ м.к.). На том же поголовье мышей культура *Y. pestis* 231 после активации оказывалась способной преодолевать противочумный иммунитет: значение LD_{50} уменьшалось на 3 порядка ($LD_{50} = n \times 10^2$ м.к.), что подтверждает ранее известное положение о том, что вакцина EV НИИЭГ формирует антибактериальный, но не антитоксический иммунитет. Разрабатываемые на данный момент вакцинные препараты должны, на наш взгляд, испытываться и на инфекционно-токсической модели чумы. Далее установлено, что значения ED_{50} стрептомицина на двух моделях инфекции не имеют статистически значимых отличий, в то время как значение ED_{50} гентамицина на инфекционно-токсической модели достоверно выше и в пересчете на суточную человекодозу превышает порог токсичности. Следовательно, стрептомицин имеет преимущества перед гентамицином при его использовании на поздних стадиях развития инфекционного процесса.

Заключение. Доказано, что модель инфекции у мышей, вызванной возбудителем с активированным гемолизатом эритроцитов крови человека токсическими компонентами клеток МТ и ЛПС, можно считать инфекционно-токсической. Эта модель позволяет дать более полную оценку средств вакцинопрофилактики и этиотропной терапии чумы.

ХОЛИНЕРГИЧЕСКАЯ АКТИВАЦИЯ НОРМАЛЬНЫХ БАЗОФИЛОВ КРОВИ *IN VITRO*

Назаров П.Г., Пронина А.П.

Институт экспериментальной медицины РАН,
Санкт-Петербург, Россия

Согласно ранее полученным данным с использованием модели анафилактического шока у сенсibili-

зированных морских свинок, вызванного повторным введением антигена, М- и Н-ацетилхолиновые рецепторы (АХР) тканей-мишеней играют важную роль в механизмах развития шока. Нейротропные холинергические лекарственные препараты, такие как ганглиоблокатор и М-холинолитик метацин и ингибитор ацетилхолинэстеразы прозерин (оба вещества являются четвертичными аммониевыми основаниями, плохо проникают через гематоэнцефалический барьер и считаются препаратами периферического действия) при введении перед анафилактическим шоком оказывали купирующее действие и предупреждали гибель экспериментальных животных [Нежинская Г.И., Назаров П.Г. и др., 2004]. Механизмы действия холинергических препаратов при купировании реакций гиперчувствительности немедленного типа изучены недостаточно, главным образом, из-за того, что *in vivo* трудно оценить раздельно действие подобных препаратов через парасимпатическую нервную систему и вненервным путем, непосредственно через АХР тканей-мишеней. Известно, что не только эндотелий сосудов, но и иммунокомпетентные клетки всех типов располагают всеми элементами автономной холинергической регуляции: собственным синтезом ацетилхолина (АХ), собственными АХР для ответа на сигналы АХ и своей ацетилхолинэстеразой (АХЭ) для разрушения избытка АХ [Kawahima K., Fujii T., 2000].

Целью нашего исследования было изучение прямого влияния холинергических препаратов на популяцию лейкоцитов, в частности, на ключевой процесс острой анафилактической реакции — выброс гистамина из базофилов крови. В качестве источника базофилов использовали лейкоциты, выделенные из крови здоровых доноров.

Клетки инкубировали *in vitro* 20 минут при 37°C со следующими препаратами: карбохолином (устойчивым аналогом АХ), ингибитором АХЭ армином, блокатором Н-АХР бензогексонием, а также с неспецифическим стимулятором выброса гистамина — агентом 48/80 и препаратом IgG человека, агрегированным прогреванием при 63°C в течение 10 минут, — после чего проводили фотометрическое определение гистамина в супернатанте методом Шора. В использованной системе влияние парасимпатической нервной системы было исключено, действие холинергических препаратов было адресовано непосредственно лейкоцитам.

Как показали результаты исследования, спонтанный выход гистамина в использованной системе составлял менее 10% от максимального выхода, регистрируемого под действием соединения 48/80. Инкубация клеток с армином усиливала выход гистамина в 2-4 раза ($p < 0,05$) по сравнению со спонтанным выходом. Эти данные означают, что накопление эндогенного АХ, происходящее при подавлении армином активности АХЭ, является фактором, ответственным за дополнительную стимуляцию выхода гистамина. Это подтвердилось результатами опытов с карбохолином, который сам по себе также усиливал выход гистамина из базофилов *in vitro*. В интактной, ничем не стимулированной популяции лейкоцитов блокирование Н-АХР бензогексонием не оказывало достоверного влияния на спонтанную активность базофилов и в среднем не изменяло степени выхода гистамина по сравнению со спонтанным уровнем. Однако если клетки, к которым добавляли армин или карбохолин для активации выброса гистамина, одновременно воздействовали еще и бензогек-

сонием, то в этих случаях блокада H-АХР снижала выброс гистамина. Полученные данные свидетельствуют о том, что холинергические факторы участвуют в регуляции эффекторных клеток аллергии через автономную, вненервную холинергическую систему, элементы которой присутствуют на лейкоцитах крови, в том числе на базофилах.

Исследование поддержано грантом РФФИ № 06-04-49629.

ВЛИЯНИЕ СУЛЬФАТИРОВАННОГО ПОЛИСАХАРИДА НА КЛЕТКИ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ У БЕСПОРОДНЫХ БЕЛЫХ МЫШЕЙ

Незговорев Д.В., Корниенко Е.Б., Шашкова Е.Ю.

Институт физиологии природных адаптации УрО РАН, г. Архангельск, Россия

Введение. Полученный нами сульфатированный полисахарид ламинарии фукоидан исследовали на динамике иммунологических реакций.

Цель и задачи. Определение изменений клеточных реакций периферической крови при внутрибрюшинном введении фукоидана.

Материалы и методы. Было проведено исследование 150 беспородных белых мышей весом 20-25 г, которым внутрибрюшинно вводили сульфатированный полисахарид (фукоидан) в количестве 5 мг/кг массы. Кровь брали через 1 ч, 1 сутки, 72, 96 ч, 7, 13, 20, 25, 30, 35 и 40 суток. Определяли общее количество лейкоцитов, изучали гемограмму и фагоцитарную активность нейтрофилов и моноцитов. Мазки фиксировали и окрашивали по Романовскому-Гимзы.

Основные результаты. Общее содержание лейкоцитов изменялось незначительно, с некоторым снижением их уровня через сутки и 72 ч (с $15,38 \pm 1,36$ до $9,77 \pm 0,96\%$). Уменьшение содержания сегментоядерных нейтрофильных лейкоцитов наблюдалось в 1-е сутки с $44,47 \pm 0,57\%$ до $38,57 \pm 0,64\%$, а увеличение содержания наблюдали через 7, 13 и 25 дней (соответственно, $47,21 \pm 0,77\%$, $47,06 \pm 1,21\%$ и $46,83 \pm 1,17\%$). Общее содержание лимфоцитов не претерпевает существенных изменений на протяжении всего периода наблюдения. Содержание моноцитов в 2 раза снижается через сутки с $18,17 \pm 0,86$ до $9,31 \pm 1,38\%$, после введения фукоидана, что возможно связано с повышением миграционной активности данных клеток к месту введения полисахарида. Мало заметные изменения в структуре гемограммы побудили нас проанализировать данные изменения состава периферической крови в абсолютных единицах. При этом установлено, уменьшается общее содержание лейкоцитов в течение 1-х суток, после введения фукоидана, происходит это за счет моноцитов, а на 3 и 4-й день — за счет снижения нейтрофильных лейкоцитов. Таким образом, периферическая кровь экспериментальных животных отражает последовательную миграцию моноцитов, а затем нейтрофилов к месту введения фукоидана. Изменение в составе моноцитограммы в периферической крови выявляется значительно позднее и является по всей вероятности, следствием миграции моноцитов в место введения препарата, через сут после начала опыта. Статистически достоверное увеличение содержания промоноцитов появляется через 72 ч, и держится до конца наблюдения. Пик этой реакции составляет 20 суток, после введения препарата, когда содержание промоно-

цитов составит $38,56 \pm 1,35$ вместо $20,15 \pm 0,75\%$ в контроле. В соответствии с этим уровень содержания, мало активных моноцитов снижается относительно контрольного уровня практически на протяжении всего срока наблюдения. Повышенное содержание больших лимфоцитов в периферической крови наблюдается через ч и сохраняется в течение 3 суток, 2-й пик регистрируется на 13 и 20 сутки $12,94 \pm 0,67$ и $12,28 \pm 0,65\%$.

Процент активных фагоцитов, нейтрофилов и моноцитов синхронно увеличивается через сут после введения препарата и на таком уровне остается до конца наблюдения. Наиболее высокая активность нейтрофилов наблюдается через 72 ч (с $46,28 \pm 9,48\%$ до $87,26 \pm 8,56\%$), а моноцитов через 96 ч с $36,54 \pm 7,64\%$ до $85,76 \pm 8,77\%$. Интенсивность фагоцитоза также повышается с максимальной выраженностью у нейтрофилов через 24 ч с $3,57 \pm 0,58\%$ до $9,26 \pm 0,68\%$; у моноцитов максимальная интенсивность фагоцитоза регистрируется через 20 дней с $0,94 \pm 0,87\%$ до $7,13 \pm 1,82\%$ с постепенным увеличением фагоцитарного показателя начиная с часа после введения препарата. Таким образом, фукоидан в дозе 5 мг/кг массы при внутрибрюшинном введении беспородным белым мышам стимулирует фагоцитарную активность нейтрофилов и моноцитов и интенсивность фагоцитоза на протяжении 40 дней после введения препарата.

Заключение. Внутрибрюшинное введение фукоидана увеличивает активность и интенсивность фагоцитоза нейтрофилов и моноцитов, усиливает миграционную активность нейтрофилов и моноцитов в место введения полисахарида в сроки после введения, снижает содержание полиморфноядерных моноцитов со значительным увеличением активных моноцитов и промоноцитов, и увеличением содержания больших лимфоцитов.

ИЗУЧЕНИЕ ДЕЙСТВИЯ ПЕПТИДА ДЕЛЬТА-СНА В КУЛЬТУРЕ ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК ЧЕЛОВЕКА

Нурбаков А.А., Михалева И.И., Сапожников А.М.

Институт биоорганической химии им. акад. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской Академии наук, Москва, Россия

Введение. Пептид дельта-сна (WAGGDASGE, delta sleep-inducing peptide, DSIP) — это эндогенный нейропептид, обладающий уникальным и ярко выраженным стресс-протективным и адаптогенным действием на организм человека и животных. Обнаружено, что периодическое введение DSIP мышам в течение жизни уменьшает частоту возникновения различного рода опухолей. Особенно эффективно DSIP предотвращает возникновение лейкозов. Как известно, жизнеспособность опухолевых клеток, как и нормальных, в значительной мере зависит от содержания внутриклеточных белков теплового шока (HSP). Повышенный уровень экспрессии данных белков предохраняет клетки от апоптоза. С другой стороны, выход HSP на поверхность трансформированных клеток стимулирует противоопухолевый иммунный ответ организма, вызывая активацию NK-клеток. Ранее было показано, что DSIP оказывает превентивное действие на стресс-индуцированное падение активности NK-клеток против опухолевых мишеней, а также способен подавлять метастазирование в экспериментах на животных. В связи с этим мы предположили,

что способность DSIP увеличивать противоопухолевую резистентность организма может быть на уровне клеток опосредована его влиянием на экспрессию HSP, ведущим к активации противоопухолевого иммунитета.

Цель работы заключалась в изучении влияния DSIP на процесс апоптоза и уровень экспрессии Hsp70 в клетках хронического миелолейкоза человека K562 во внутриклеточном пространстве и на клеточной поверхности.

Материалы и методы. Клетки линии K562 выращивали в полной питательной среде на основе RPMI 1640, содержащей 10% фетальной сыворотки (FCS), 0,2% NaHCO₃ и 100 мкг/мл линкомицина (все «Sigma», США), при 37°C во влажной атмосфере, содержащей 5% CO₂. При проведении эксперимента клеточные культуры в конце логарифмической фазы роста пересевали в 96-луночные планшеты (концентрация клеток в лунках составляла 2,5 × 10⁶ на мл среды) и инкубировали клетки в течение 16 ч в присутствии пептида дельта-сна в концентрации 10⁻⁶ М и без него (контроль). Измерение уровня экспрессии Hsp70 и процентного содержания апоптотных клеток осуществляли цитофлюориметрическим методом.

Результаты и обсуждение. DSIP в концентрации 10⁻⁶ М уменьшал уровень экспрессии внутриклеточного Hsp70 примерно на 12%. Процентное содержание апоптотных клеток оставалось неизменным, что говорит в пользу непрямого влияния пептида на возникновение и развитие опухоли *in vivo*. Мы предположили, что DSIP индуцирует выход Hsp70 на клеточную поверхность, что и приводит к активации противоопухолевого иммунного ответа у животных. Результаты наших экспериментов показали, что при инкубации клеток с пептидом дельта-сна количество клеток, экспрессирующих Hsp70 на поверхности, увеличивается примерно на 25%. При этом среднее содержание Hsp70 на клеточной поверхности уменьшается примерно на 12%, что может быть связано со сбрасыванием данных протеинов в окружающую среду.

Заключение. Пептид дельта-сна в концентрации 10⁻⁶ М уменьшает уровень экспрессии внутриклеточного Hsp70 в клетках линии K562 и не влияет на процесс апоптоза. При инкубации клеток в присутствии DSIP увеличивается доля клеток, экспрессирующих Hsp70 на поверхности, что может играть существенную роль в повышении противоопухолевой устойчивости организма человека и животных.

ВОВЛЕЧЕНИЕ ГЛЮКОЗЫ В ЗАВИСИМУЮ ОТ ФОСФАТИДИЛИНОЗИТОЛ-3-КИНАЗЫ ГЕНЕРАЦИЮ АКТИВНЫХ ФОРМ КИСЛОРОДА НЕЙТРОФИЛАМИ

Попова А.Ф.^{1,2}, Сафронова В.Г.²

¹ Нижнегородский государственный университет, г. Нижний Новгород, Россия

² Институт биофизики клетки Российской Академии Наук, г. Пущино, Россия

Введение. Респираторный взрыв нейтрофилов находится под строгим контролем внутриклеточных сигнальных систем, потому что избыточная продукция активных форм кислорода (АФК) является повреждающим фактором для клеток организма-хозяина. Одним из важнейших регуляторных белков в нейтрофилах является фосфатидилинозит-3-киназа (ФИЗК). Она контроли-

рует ключевые функции клетки и является критичной для активации НАДФН-оксидазы, ответственной за генерацию АФК. При активации респираторного взрыва нейтрофилов усиливается утилизация глюкозы. Однако вопрос о вовлечении ФИЗК в этот процесс остается открытым.

Задача работы: сравнить роль ФИЗК в генерации АФК покоящимися и активированными нейтрофилами при варьировании условий по нагрузке клеток глюкозой.

Материалы и методы. Работа проведена на перитонеальных вызванных нейтрофилах мышей-самцов аутбредной линии NMRI. Интенсивность генерации АФК оценивали по люминол-зависимой хемилуминесценции. После изоляции клетки хранили в среде, содержащей 5 мМ D-глюкозу, или в среде без глюкозы, при +4°C в течение 1 ч. Перед регистрацией нейтрофилы инкубировали с вортманнином, ингибитором ФИЗК, в одной из трех сред: в среде, содержащей 5 мМ D-глюкозу; в среде без добавления глюкозы; в среде с добавлением 5 мМ 2-дезоксид-глюкозы (2-ДОГ), неметаболизируемого аналога D-глюкозы. Варьировали последовательность подачи вортманнина и клеток экспериментальные ячейки. Нейтрофилы активировали хемотаксическим агентом N-формил-Мет-Лей-Фен (ФМЛФ) в концентрации 10 мкМ.

Основные результаты. При наличии или отсутствии глюкозы в среде хранения и регистрации обнаружено зависимое от концентрации вортманнина подавление базового уровня продукции АФК нейтрофилами. Эффект не зависел от последовательности добавления вортманнина: в одном случае вортманнин добавляли к прикрепленным клеткам, в другом – он содержался в среде, в которую добавляли клетки. Показано зависимое от концентрации действие вортманнина на респираторный взрыв нейтрофилов, вызванный ФМЛФ. При подаче вортманнина на прикрепленные клетки он оказывал ингибирующее действие на респираторный взрыв во всех средах, причем наибольший эффект наблюдался в среде с 2-ДОГ. При действии вортманнина на неприкрепленные клетки в присутствии D-глюкозы происходило усиление респираторного взрыва, тогда как в среде без глюкозы – его подавление.

Заключение. Поддержание базового уровня продукции АФК нейтрофилами осуществляется за счет утилизации глюкозы при участии ФИЗК. Она усиливает генерацию АФК покоящимися клетками вне зависимости от адгезии. В прикрепленных нейтрофилах утилизация глюкозы не является обязательным условием для потенцирования активности НАДФН оксидазы ФИЗК. В неприкрепленных клетках в присутствии глюкозы ФИЗК подавляет ее активность. Вероятно, активность ФИЗК в неприкрепленных клетках направлена на сдерживание продукции АФК, что требует утилизации глюкозы.

АНАЛИЗ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ ИММУННОГО ОТВЕТА И ВОСПАЛЕНИЯ В МОДЕЛИ ЛАТЕНТНОЙ ТУБЕРКУЛЕЗНОЙ ИНФЕКЦИИ У МЫШЕЙ

Радаева Т.В., Сосунов В.В., Апт А.С.

Центральный Научно-Исследовательский Институт Туберкулеза РАМН, Москва, Россия

Согласно современным представлениям, все случаи туберкулеза у взрослых являются проявлением реактива-

ционной болезни. Корреляты протективного иммунного ответа во время активной фазы инфекции в большинстве своем неизвестны. Еще меньше данных получено о состоянии и функции органов иммунной системы и иммунной системы собственно легкого во время латентного туберкулеза. Не приходится сомневаться, что понимание молекулярных механизмов переключений, происходящих в иммунной системе при переходе инфекции из латентной в активную, поможет разработать новые подходы к контролю туберкулезной инфекции в человеческой популяции.

В модели латентной туберкулезной инфекции, разработанной в нашей лаборатории, мы изучали чувствительных к туберкулезу мышей линии I/St на всех стадиях развития инфекции: активный процесс, латентная (не регистрируются метаболически активные микобактерии) фаза, реактивация туберкулезной инфекции. Были получены данные об изменении патоморфологической картины легкого, продукции цитокинов клетками легкого.

Мы считаем, что переход хронической или латентной инфекции в активную фазу сопровождается изменением профиля экспрессии генов хозяина, поэтому выделяли РНК из легких и селезенок животных на всех этапах эксперимента и оценивали экспрессию различных генов, продукты которых вовлечены в воспалительные каскады, являются значимыми для внутриклеточного сигналинга, относятся к стромальным элементам паренхиматозных органов и цитоскелету.

По нашим наблюдениям, при борьбе с микобактерией важны не только мощные эффекторные реакции организма, но и их сбалансированность. Так, тяжелая патология, развивающаяся у чувствительных мышей при прогрессировании инфекции и приводящая к гибели, является результатом внутреннего дисбаланса в экспрессии генов легочной ткани, проявляющегося в неконтролируемом воспалении.

С помощью микрочипов HVD Biotech (Австрия) мы оценили экспрессию следующих генов: хемокинов CCL1-20, CXCL1, CXCL2, CXCL4, CXCL5, CXCL9, CXCL10, CXCL11, CXCL12, CXCL13, CXCL14, CXCL15 и их рецепторов, интерлейкинов IL1-22 и их рецепторов, Csf1(M-CSF), Csf2(GM-CSF), Csf3(G-CSF), интерферонов α , β , γ , TNF α , TNF β , TGF α и β , транскрипционных факторов, адгезивных молекул.

Результаты проведенных экспериментов приблизили нас к пониманию того, какие именно изменения в экспрессии генов приводят к развитию туберкулеза, к переходу латентной инфекции в активную и чем эффективный механизм защиты хозяина отличается от патологического несбалансированного ответа.

FCRLA – НОВЫЙ МАРКЕР АНТИГЕН-ЗАВИСИМОЙ ДИФФЕРЕНЦИРОВКИ В-ЛИМФОЦИТОВ

Решетникова Е.С., Мечетина Л.В., Таранин А.В.

*Институт цитологии и генетики СО РАН,
г. Новосибирск, Россия*

Антиген-зависимая дифференцировка В-лимфоцитов приводит к возникновению гетерогенного пула клеток, состоящего из плазмобластов, коротко- и долгоживущих плазматических клеток и В-клеток памяти. Фенотипи-

ческие характеристики, а также функциональные взаимоотношения этих субпопуляций на сегодня до конца неясны. Настоящая работа посвящена изучению экспрессии FCRLA – нового белка из семейства лейкоцитарных Fc-рецепторов мыши и человека. FCRLA является внутриклеточным белком, который у человека экспрессируется преимущественно в клетках зародышевых центров. Нами впервые проведен анализ экспрессии FCRLA в лимфоидных тканях мыши при помощи двойного иммуофлюоресцентного окрашивания с использованием лимфоцитарных дифференцировочных маркеров. Обнаружено, что FCRLA выявляется в В-клетках всех лимфоидных тканей мыши. FCRLA экспрессируется В-2 В-лимфоцитами и не обнаруживается в В-1 клетках. FCRLA⁺ В-клетки можно подразделить на две субпопуляции: с низким и высоким уровнем экспрессии. Фолликулярные В-клетки с фенотипом IgM⁺/IgD⁺/CD19⁺/B220⁺/CD138⁻ отличаются низким уровнем экспрессии FCRLA. Немногочисленные клетки с высоким содержанием FCRLA обнаружены возле сосудов в красной пульпе и Т-клеточной зоне селезенки, а также в мозговой зоне лимфоузлов. Яркие FCRLA⁺ клетки почти не встречаются в зародышевых центрах и, как правило, не имеют цитоплазматических иммуноглобулинов. Стимуляция спленоцитов мыши *in vitro* с помощью ЛПС показала, что дифференцировка В-клеток в IgM-секретирующие плазматические клетки сопровождается резким уменьшением экспрессии FCRLA. Вместе с тем выявляется небольшая популяция ярких FCRLA⁺ клеток, которые чаще всего не окрашиваются на цитоплазматические иммуноглобулины. Дифференциальная регуляция экспрессии FCRLA в стимулированных В-лимфоцитах позволяет использовать его в качестве маркера для исследования факторов, определяющих созревание В-клеток в клетки памяти или плазматические клетки.

ВВЕДЕНИЕ ВАКЦИНЫ BCG PER OS В СОЧЕТАНИИ С РЕВАКЦИНАЦИЕЙ ДНК-ВАКЦИНАМИ: НОВЫЙ ПОДХОД К ПРОТИВОТУБЕРКУЛЕЗНОЙ ВАКЦИНАЦИИ

**Рубакова Э.И., Кондратьева Т.К., Линге И.А.,
Кондратьева Е.В., Радаева Т.В., Хлебников В.С.,
Апт А.С.**

ЦНИИ Туберкулеза РАМН, Москва, Россия

Вакцина BCG – единственная применяемая в настоящее время вакцина против туберкулеза (ТБ) – высоко эффективна против диссеминированного ТБ детей, туберкулезного менингита и милиарного ТБ [Colditz et al., 1994, Rodrigues et al., 1993], но неэффективна против легочного туберкулеза взрослых. Один из подходов сделать вакцинацию против ТБ более эффективной – это улучшить вакцину BCG, изменив способ ее введения и/или использовать новые вакцины в комплексе с BCG. Известно, что гетерологичная вакцинация, основанная на первичном введении одного типа вакцины и повторной стимуляции другим типом вакцины (prime-bust vaccination strategy), например, примирование живой вакциной и рестимуляция кодирующими антигенами плазмидами или непатогенными вирусами, нередко приводит к усилению протективного иммунного ответа [Feng C. et al., 2001].

Ранее было показано, что иммунизация ДНК-вакцинами, экспрессирующими антиген Ag85B микобактерий,

защищает мышей от ТБ, хотя и в меньшей степени, чем вакцина BCG [Kamath et al., 1999; Lozes et al., 1997].

Целью настоящей работы было оценить эффективность введения вакцины BCG *per os* (поскольку вакцинация без инъекции — это важный приоритет ВОЗ) и создать новые схемы вакцинации с «подстегиванием» иммунного ответа ДНК-вакциной на модели туберкулезной инфекции у мышей.

Нами было установлено, что введение BCG *per os* несколько уступает по протективному эффекту подкожной вакцинации при заражении мышей C57BL/6. При использовании комбинации введения вакцины BCG *per os* и однократного внутримышечного введения плазмидной ДНК, кодирующей микобактериальные антигены Ag85 или ESAT/6, оказалось, что такая гетерологичная схема вакцинации достоверно усиливает протективный эффект BCG и обеспечивает уровень защиты, аналогичный подкожному введению живой вакцины. Мы продолжаем оптимизацию схем, дозировок и временных интервалов вакцинации по стратегии prime-bust.

Работа выполняется при финансовой поддержке МНТЦ (грант № 3257).

КЛЕТочные и молекулярные механизмы нарушения взаимодействия иммунной и нейроэндокринной систем при стрессе и синдроме хронической усталости

Рыбакина Е.Г., Шанин С.Н., Фомичева Е.Г., Пиванович-Штэрк И.Ю., Козинец И.А., Корнева Е.А.

ГУ НИИ экспериментальной медицины РАМН, Санкт-Петербург, Россия

В настоящее время установлено, что развитие как стрессорной реакции, так и синдрома хронической усталости (СХУ) сопровождается нарушением взаимодействия иммунной и нейроэндокринной систем организма. **Целью** работы явилось исследование изменений показателей активности защитных функций организма, в том числе трансдукции сигнала цитокина Интерлейкина-1 β (ИЛ-1 β) по сфингомиелиновому пути в иммунокомпетентных и нервных клетках, функциональной активности натуральных киллерных (НК) клеток селезенки и тимоцитов, а также уровня глюкокортикоидных гормонов в крови мышей и крыс при стрессорных воздействиях и СХУ. В работе использованы экспериментальные модели стресса различной длительности и интенсивности на крысах и мышах, вызывающие стимуляцию либо супрессию гуморального иммунного ответа, а также модель иммунологически индуцированного СХУ, вызванного центральным или системным введением крысам полиинозитиловой-полицитидиловой кислоты (Поли И:Ц). Активность мембранного фермента нейтральной сфингомиелиназы (Н-СМазы) — ключевого энзима сфингомиелинового каскада — определяли по методу В. Rao и М. Sprence (1976) в собственной модификации.

Установлено, что стрессорные воздействия, вызывающие развитие иммуностимуляции или иммуносупрессии, приводят, соответственно, к усилению или угнетению комитогенного действия ИЛ-1 β на тимоциты мышей, а также активности Н-СМазы в мембранах иммунокомпетентных и нервных клеток. Продемонстрированы мо-

дулирующие эффекты глюкокортикоидных гормонов на интенсивность трансдукции сигнала ИЛ-1 β по сфингомиелиновому пути в этих клетках. Активность Н-СМазы в мембранной фракции P2 коры головного мозга крыс снижалась на 3-й день после внутрибрюшинного введения животным Поли И:Ц, в то время как цитотоксическая активность НК клеток селезенки в этот период времени возрастала. Уровень кортикостерона в крови крыс повышался в течение первых 2-х часов и 5-7 дней после системного введения животным Поли И:Ц и затем снижался к 14-му дню. Центральное введение Поли И:Ц в боковые желудочки мозга, наоборот, индуцировало снижение как цитотоксической активности НК клеток селезенки, так и концентрации кортикостерона в сыворотке крови. Результаты исследования совместно с ранее полученными данными о сходстве путей трансдукции сигнала ИЛ-1 β в иммунокомпетентных и нервных клетках позволяют предположить, что нарушения нейро-иммунных взаимодействий при развитии стрессорной реакции и СХУ, включая изменения активности гипоталамо-гипофизарно-адренорикальной системы, реализуются как на уровне клеток иммунной системы, так и непосредственно на мембранах клеток головного мозга. Работа поддержана грантом РФФИ № 06-04-48609.

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ РЕКОМБИНАНТНОЙ И НАТИВНОЙ J-ЦЕПЕЙ ПОЛИМЕРНЫХ ИММУНОГЛОБУЛИНОВ (Ig) ЧЕЛОВЕКА ДЛЯ СОЗДАНИЯ ГИБРИДОМ

Самойлович М.П., Грязева И.В., Климович Б.В., Артемьева А.К., Ибрагимова Д.Г., Климович В.Б.

ФГУ ЦНИПРИ МЗиСР РФ, Санкт-Петербург, Россия

J-цепь — кислый полипептид (15 kDa), содержащий 9 остатков цистеина, входит в состав IgM, полимерного IgA и SIgA. До сих пор J-цепь не отнесена ни к одному из известных семейств белков. Ее функции, происхождение и распространение в животном мире далеко не ясны.

Целью работы было создание семейства гибридом, продуцирующих моноклональные антитела (МКАТ) против J-цепи человека.

Для иммунизации были получены препараты нативной и рекомбинантной J-цепей. Нативную J-цепь выделяли из парапротеина IgM-каппа восстановлением и алкилированием дисульфидных связей с последующим фракционированием на сефакриле S-300 и хроматографией на колонках с иммобилизованными МКАТ против каппа- и против мю-цепей Ig человека. Содержание J-цепи в препарате контролировали с помощью двух коммерческих МКАТ (JC88 и CBL116), имеющих разную эпитопную специфичность. Для создания рекомбинантной J-цепи были использованы праймеры, фланкирующие кодирующую часть кДНК (исключая последовательность, кодирующую лидерный пептид) и содержащие сайты распознавания рестриктаз BamHI и XhoI. Полученный в ПЦР фрагмент был обработан рестриктазами и лигирован в аналогично рестрицированный вектор pRSET A. Плазмидой трансформировали клетки *E. coli* штамма TOP10F. Плазмиды из 5 рекомбинантных клонов были секвенированы в двух направлениях. Вектором, выделенным из одного из клонов, трансформировали клетки *E. coli* штамма BL21(DE3)pLys(S). Экспрессию индуцировали в жидкой

культуре изопропилтиогалактозидом. В лизате бактерий при разделении электрофорезом была обнаружена полоса, интенсивность которой нарастала в процессе культивирования, а молекулярная масса соответствовала предполагаемому размеру белка. Наличие J-цепи в лизате подтвердили «дот» анализом с помощью кроличьей антисыворотки против J-цепи человека (Biogenex, PU047-UP). Белок после очистки на колонке с никель-Сефарозой использовали для иммунизации мышей и скрининга гибридом.

Две группы мышей SJL/J иммунизировали нативной или рекомбинантной J-цепью сначала в полном, затем в неполном адьюванте Фрейнда. При введении нативной J-цепи в сыворотках мышей преобладали антитела против высокоиммуногенных минорных примесей (каппа-цепей и мю-цепей). Препарат рекомбинантной J-цепи индуцировал в высоком титре антитела, которые однако не реагировали с препаратом нативной J-цепи. Мышей третьей группы двукратно иммунизировали препаратом нативной J-цепи в адьюванте, а спустя 1,5 мес 7-кратно вводили раствор рекомбинантной J-цепи. Эта схема иммунизации позволила получить сыворотки, содержащие антитела, реагирующие как с рекомбинантным белком, так и с нативной J-цепью.

Для создания гибридом в трех независимых опытах использовали лимфоциты мышей из каждой иммунизированной группы. Антигенами для позитивной селекции служили препараты рекомбинантной и нативной J-цепей, восстановленные sIgA и IgM. Для негативной селекции применяли нативный IgM-каппа-типа, свободные каппа-цепи и лизат нетрансформированных бактерий *E. coli*. Наиболее эффективным оказалось слияние, в котором использовали лимфоциты мышей, иммунизированных последовательно нативной и рекомбинантной J-цепью. В результате получено 29 первичных гибридомных культур, продуцирующих антитела против J-цепи.

Работа выполняется при финансовой поддержке гранта РФФИ 05-04-48860.

ИЗУЧЕНИЕ ИММУНОФЕНОТИПА И ПРОДУКЦИИ ЦИТОКИНОВ У МЫШЕЙ ПОСЛЕ ВВЕДЕНИЯ ДОЗЫ ЦИКЛОФОСФАНА (ЦФ), ПОДАВЛЯЮЩЕЙ ИММУННЫЙ ОТВЕТ

Семенова И.Б., Ахматова Н.К., Лосева Л.Ф.

ГУ НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф. Гамалеи РАМН, Москва, Россия

ГУ НИИ вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова РАМН, Москва, Россия

В литературе широко обсуждается угнетающее влияние цитостатика циклофосфана на гуморальное и клеточное звенья иммунного ответа, установленное как на экспериментальных моделях, так и у пациентов, получавших этот препарат в составе комплексного лечения онкологических заболеваний или после трансплантации органов. Однако этот феномен описан на организменном уровне, а молекулярные и клеточные механизмы иммуносупрессии, индуцированной ЦФ к началу наших исследований, оставались мало изученными.

Целью нашей работы явилось определение содержания про- и противовоспалительных цитокинов в сыво-

ротке крови и супернатантах спленоцитов, а также экспрессии поверхностных молекул (CD и NK1.1.) на спленоцитах у мышей, получивших ЦФ.

В задачи работы входило определение: 1. уровня основных цитокинов – ИЛ-1 β , ИЛ-2, ИЛ-4, ИЛ-6, ИЛ-12, ФНО α , ИФН γ в сыворотке и супернатантах спленоцитов (спонтанная и ФГА-индуцированная продукция) у мышей после введения ЦФ; 2. изменения экспрессии поверхностных маркеров: CD3, CD4, NK1.1., CD25, CD8, CD3/NK, CD4/CD25, CD19 на спленоцитах мышей, которым был введен ЦФ.

Материалы и методы. Опыты проводили на мышах линии СВА. В работе использовали цитостатик ЦФ, который инокулировали в дозе, вызывающей угнетение иммунного ответа при применении мышам *in vivo* (100 мг/кг однократно внутрибрюшинно). Через 24-36 ч получали сыворотку и извлекали селезенки. В эти же сроки определяли экспрессию поверхностных молекул на спленоцитах с помощью проточного цитометра FacsCalibur («Becton Dickinson», США) Клетки селезенки тех же животных культивировали 24-48 ч (без или в присутствии ФГА). Содержание цитокиновых молекул в сыворотках и надосадочной жидкости проводили иммуноферментным методом («Biosource», Бельгия). В контрольные группы входили интактные животные.

Результаты. В ходе работы выявлено, что через 36 ч после введения 100 мг/кг ЦФ развивалось преимущественно угнетение продукции следующих цитокинов: ИЛ-2, ИЛ-4, ИЛ-6, ИЛ-10, ФНО α , при сохранении содержания ИЛ-1 β и ИЛ-12 на уровне контрольных показателей.

Следует заметить, что уменьшение содержания цитокинов было выражено по-разному при исследовании различных биологических материалов. Так, снижение содержания ИЛ-4 и ИЛ-10 регистрировали в сыворотке и супернатантах спленоцитов (как без стимуляции, так и при стимуляции ФГА). Угнетение содержания ИЛ-2, ИЛ-6, ФНО α отсутствовало в сыворотках и было выражено сильнее по сравнению со спонтанной продукцией этих цитокиновых молекул при исследовании надосадочных жидкостей, полученных после стимуляции клеток селезенки митогеном. Отмечали также тенденцию к снижению содержания сывороточных ИЛ-1 β и ИЛ-12.

При анализе данных о продукции ИФН γ при введении мышам ЦФ установлено, что содержание этого цитокина в сыворотке не отличалось от такового у интактных животных, в то время как уровень спонтанной секреции спленоцитами был увеличен в 2,5 раза на фоне значительного (90%) снижения продукции данных цитокиновых молекул после культивирования клеток селезенки в присутствии ФГА.

Через 36 ч поле введения ЦФ зарегистрировано увеличение экспрессии маркеров CD3, CD4, NK1.1., CD8, CD25 при неизменной экспрессии NKT-клеток и T-регуляторных лимфоцитов (CD3/NK и CD4/CD25 соответственно).

В отдельной серии опытов, в которых учет результатов производили через 24 ч установлено резкое снижение экспрессии CD19 молекул.

Заключение. Наши данные свидетельствуют о том, что ЦФ в испытанной дозе приводит к супрессии T- и B-клеточного звеньев иммунного ответа, которая проявляется подавлением продукции цитокинов Th1 (ИЛ-2) и Th2 (ИЛ-4, ИЛ-10) и макрофагов (ИЛ-6, ФНО α) на фоне от-

сутствия изменения содержания субпопуляции Т-регуляторных лимфоцитов. По-видимому, для коррекции этого дефекта могут быть использованы иммуномодуляторы различной природы (возможно их сочетание).

О ДЕЙСТВИИ ИММУНОМОДУЛЯТОРА ФОСПРЕНИЛ НА ЭФФЕКТОРНУЮ И РЕГУЛЯТОРНУЮ СУБПОПУЛЯЦИИ Т-ЛИМФОЦИТОВ В РЕАКЦИИ ГЗТ *IN VIVO*

Соболев С.М., Николаева Т.Н., Пронин А.В.

ГУ НИИЭМ им. Н.Ф. Гамалеи РАМН, Москва, Россия

Фоспренил (ФП) — иммуномодулятор растительного происхождения, относящийся к группе фосфорилированных полипептидов, эффективно используется в ветеринарии с целью повышения иммунного статуса и продуктивности с/х животных. В настоящее время механизмы иммуномодулирующего действия ФП находятся в стадии изучения.

Цель работы. Изучали влияние ФП на реакцию гиперчувствительности замедленного типа (ГЗТ) к корпускулярному листериозному антигену у мышей. В развитии этой реакции участвуют две субпопуляции CD4⁺-лимфоцитов: эффекторы (Th1) и супрессоры (Treg), которые, соответственно, факультативно и облигатно зависят от интерлейкина-2 (ИЛ-2), а также индуکتивно и конститутивно экспрессируют CD25. Соотношения в размерах и активности этих субпопуляций лимфоцитов в индуктивной фазе реакции ГЗТ определяют выраженность ее эффекторной (индикаторной) фазы, которую рассматривают в качестве показателя состояния клеточного иммунитета.

Материалы и методы. Листерийный антиген — инактивированную парами хлороформа агаровую культуру *Listeria monocytogenes*, разведенную физиологическим раствором до концентрации 5 × 10⁹ КОЕ/мл, хранили до использования при температуре -20°C.

Постановку реакции ГЗТ на мышах из Центрального питомника лабораторных животных РАМН проводили по стандартному методу. Премирующая доза антигена 5 × 10⁵ КОЕ/0,2 мл п/к. Разрешающая доза 5 × 10⁷ КОЕ/0,02 в стопу задней лапы. Интервал между первым и вторым введением антигена 6 сут. Местную воспалительную реакцию оценивали через 24 ч после введения разрешающей дозы антигена по разнице в массе опытной и контрольной стоп. Сдвиг индекса реакции (ИР) между опытными и контрольными (несенсибилизированными) группами животных оценивали как положительный при разнице в показателях ≥ 5%. При разных схемах опытов использовали необходимые дозы 0,4% ФП (производство ЗАО «Микро-плюс», Москва), рекомбинантной формы ИЛ-2 («Ронколейкин»), а также гамма-глобулина для в/в введения (IMBio) и овалбумина (Sigma).

Результаты и заключение. Было установлено, что ФП ингибировал ГЗТ в первые двое суток ее индуктивной фазы, совпадающей по времени с экспрессией CD25 и формированием у Th1 эффекторов высокоаффинного рецепторного комплекса ИЛ2R. Этот эффект *in vivo* находится в соответствии с ранее обнаруженной у ФП способностью *in vitro* конкурировать с анти-CD25 антителами за связь с ИЛ2R [Пронин А.В. с соавт., 2000]. Предобработка животных ФП за сутки до сенсибилизации не влияла на последую-

щее формирование у Th1-эффекторов тримерного рецепторного комплекса к ИЛ-2 и, соответственно, на развитие ГЗТ. Известно, однако, что такой комплекс конститутивно представлен в субпопуляции Treg, которая должна быть, поэтому чувствительна к экзогенному ИЛ-2 и ФП до премирания. В связи с этим последовательная предобработка животных за двое суток вначале рекомбинантным ИЛ-2, а на следующие сут ФП (но не каждым из них в отдельности), усиливала ГЗТ относительно контроля. Очевидно, что роль рекомбинантного ИЛ-2 в данном случае заключается в оптимизации взаимодействия ФП с CD25.

Все эти обнаруженные особенности поведения ФП указывают на то, что он, как и ИЛ-2 обладает лектиноподобной активностью в отношении структурно ограниченной группы маннозосодержащих олигосахаридов в составе CD25 и таких гликопротеинов, как гамма-глобулин и овалбумин. Уже отмечалось [Соболев С.М., Пронин А.В., 2000], что гамма-глобулин неиммунно инактивируя ИЛ-2, тормозит зависимую от него пролиферацию Кон А-бластов. Теперь же установлено, что гаммаглобулин и овалбумин *in vivo*, конкурируя с ИЛ-2R за связь с эндогенным ИЛ-2, тормозят ее развитие, а ФП, образуя с этими гликопротеидами нейтральные комплексы, восстанавливают ее.

Показательно также, что в определенных условиях ФП может стимулировать ГЗТ, избирательно элиминируя супрессорную активность субпопуляции Treg-лимфоцитов.

МЕТОД ОЦЕНКИ АДГЕЗИИ СУБПОПУЛЯЦИЙ МОНОНУКЛЕАРОВ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ К ЭНДОТЕЛИАЛЬНЫМ КЛЕТКАМ

Соколов Д.И., Селютин А.В., Старикова Э.А., Лесничья М.В., Аржанова О.Н., Сельков С.А.

ГУ НИИ акушерства и гинекологии им. Д.О. Отта РАМН, Санкт-Петербург, Россия

Адгезия мононуклеаров крови к эндотелиальным клеткам является важнейшим этапом в процессе миграции иммунокомпетентных клеток в ткани, инициации воспалительной реакции, осуществлении иммунологического надзора.

Целью настоящего исследования была разработка метода оценки степени адгезии субпопуляций мононуклеаров периферической крови к эндотелиальным клеткам. Определение субпопуляций мононуклеаров в цельной крови 15 больных гестозом женщины проводили при помощи стандартного метода проточной цитофлюориметрии (FacsScan, BD, США) с использованием антител CD3, CD16, CD56, CD8, CD4, CD14, CD45. Из этой же периферической крови выделяли мононуклеары стандартным методом с помощью центрифугирования в градиенте плотности фиколл-верографин. Для оценки степени адгезии мононуклеаров периферической крови использовали человеческие эндотелиальные клетки линии EA.Hy926, которые культивировали в среде следующего состава: среда DMEM с добавлением 10% инактивированной эмбриональной телячьей сыворотки («ICN», США), 50 мкг/мл сульфата гентамицина, 2 мМ L-глутамин, НАТ («ICN», США). К эндотелиальным клеткам, образовавшим конфлуэнтный монослой, добавляли мононуклеары периферической крови в концентрации 1 млн клеток, и инкубировали в те-

чение 1 ч. После инкубации клетки трижды отмывали фосфатно-солевым буферным раствором для удаления неприкрепившихся мононуклеаров и снимали эндотелиальные и адгезировавшие к ним клетки раствором Версена. Затем определяли субпопуляционный состав адгезировавших мононуклеаров методом проточной цитометрии с использованием вышеуказанного набора антител и сравнивали его с составом цельной периферической крови.

Сравнительный анализ полученных данных свидетельствует о повышенной способности к адгезии у моноцитов по сравнению с лимфоцитами, о чем свидетельствует снижение отношения лимфоциты/моноциты, определенном после адгезии ($0,78 \pm 0,16$) по сравнению с этим соотношением в цельной крови ($3,95 \pm 0,64$, $p < 0,001$). Отношение Т-лимфоцитов к НК-клеткам ($CD3^+$ к $CD3^-CD16^+CD56^+$), а также отношение цитотоксических Т-клеток ($CD8^+$) к Т-хелперным клеткам ($CD4^+$) не изменялось. Способность к адгезии к эндотелию неактивированных моноцитов с фенотипом $CD14^+CD16^-$ была несколько выше, чем активированных (с фенотипом $CD14^+CD16^+$), о чем свидетельствует увеличение относительного содержания клеток данного фенотипа после адгезии ($23,89 \pm 5,64$) по сравнению с таковым в цельной крови ($16,35 \pm 1,91$, $p < 0,01$).

Разработанный нами метод может использоваться в лабораторно-диагностической практике для определения функциональной активности мононуклеаров периферической крови.

Работа поддержана грантом Президента РФ НШ-5268.2006.7

АНТИОКСИДАНТНАЯ СИСТЕМА ЗАЩИТЫ РАЗЛИЧНЫХ ПОПУЛЯЦИЙ ЛИМФОЦИТОВ В НОРМЕ И ПРИ РАЗВИТИИ ИММУННОГО ОТВЕТА

Соколова Т.Ф., Долгих Т.И., Емельянов Ю.В., Турок Н.Е.

Омская государственная медицинская академия, г. Омск, Россия

Введение. Универсальная патогенетическая роль окислительного стресса – нарушения баланса в системах генерации и детоксикации АФК в организме – доказана в многочисленных исследованиях. Наряду с этим показано участие АФК в физиологических процессах: в метаболизме клеток в качестве промежуточных продуктов синтеза, в качестве сигнальных молекул, запускающих клеточный иммунный ответ, в обеспечении микробицидности фагоцитирующих клеток. Однако, о состоянии антиоксидантной защиты лимфоцитов, поддерживающей баланс в системах генерации и детоксикации АФК, практически неизвестно.

Цель работы: получение сравнительной характеристики активности антиокислительной системы лимфоцитов крови, тимуса и селезенки крыс в норме и при развитии первичного иммунного ответа на тимусзависимый антиген.

Материал и методы. В исследование включены 63 белые крысы массой 200-220 г, которые составили 2 группы. В 1-ю группу были включены 33 здоровые интактные крысы, во 2-ю – 30 крыс, иммунизированных эритроцитами барана (внутривенно в количестве 3×10^9 клеток). Исследования во 2-й группе крыс проводили на пике иммунного ответа (5-е сутки после иммунизации). Чис-

тую популяцию лимфоцитов (ЛЦ) выделяли из крови и гомогенатов тимуса и селезенки крыс на градиенте фиколл-верографин. В 10^9 клеток колориметрическим и кинетическим методами на автоматическом биохимическом анализаторе «Autolab» с помощью коммерческих реактивов фирм «Randox» и «Sentinel» определяли активность супероксиддисмутазы (СОД), каталазы, глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы (Гл-6-Ф-ДГ), глутатионредуктазы (ГлР) и уровень восстановленного глутатиона.

Результаты. Было установлено, что активность основного антиоксидантного фермента клеток – СОД в ЛЦ крови в 2,3 раза превышала аналогичную в ЛЦ тимуса ($p < 0,05$), а активность каталазы – фермента, эффективно разлагающего высокие концентрации гидроперекисей в пероксисомах клеток, в ЛЦ крови в 1028 раз превышал активность данного фермента в ЛЦ тимуса ($p < 0,05$) и в 4 раза – в ЛЦ селезенки ($p < 0,05$). В цитозоле и митохондриях ЛЦ крови H_2O_2 также более интенсивно, чем в ЛЦ органов сравнения расщеплялась в результате глутатионпероксидазной реакции, одним из важнейших компонентов которой является глутатион. Фонд глутатиона в ЛЦ крови 4-8-кратно превышал аналогичный в ЛЦ иммунокомпетентных органов и интенсивно пополнялся за счет усиленного восстановления глутатиондисульфида в глутатионредуктазной реакции. Выявлено, что активность ГлР ЛЦ крови в 4 раза выше, чем в тимоцитах ($p < 0,05$). В циркулирующих ЛЦ быстрее протекало и восстановление НАДФ в результате реакций, катализируемых ферментами пентозного цикла, о чем свидетельствует наибольшая активность Гл-6-Ф-ДГ в ЛЦ крови. Спленоциты здоровых крыс отличались высоким уровнем антирадикальной защиты. Они в 2 раза лучше циркулирующих ЛЦ ($p < 0,05$) и в 4 раза лучше тимоцитов ($p < 0,001$) обеспечены СОД. При этом антиперекисная защита лимфоидных клеток селезенки относительно ЛЦ крови низкая. Активность каталазы ($p < 0,05$) и уровень глутатиона ($p < 0,01$) в ЛЦ селезенки в 4 раза ниже, чем в ЛЦ крови. В ЛЦ тимуса активность СОД и концентрация глутатиона в 2-4 раза, а каталазы в сотни и тысячи раз ниже, чем в других популяциях ЛЦ. Это объясняет особую чувствительность тимоцитов к действию реактивных кислородных радикалов. Низкий уровень активности антиоксидантных и антиперекисных ферментов в ЛЦ тимуса, вероятно, генетически детерминирован и является одной из составляющих селективного механизма отбора. Введение тимусзависимого антигена и его преимущественное поступление в селезенку сопровождалось развитием адекватного иммунного ответа на пике которого регистрировалось двукратное снижение активности СОД ($p < 0,05$) в ЛЦ данного органа. Достоверных изменений ферментного профиля в ЛЦ тимуса и ЛЦ крови в ходе развития иммунного ответа не выявлено, что является закономерным, так как тимус огражден от проникновения в его ткань антигенов, а в кровотоке иммунных реакций, как правило, не происходит.

Таким образом, у здоровых животных активность ферментов антиоксидантной и особенно антиперекисной системы в ЛЦ крови отличается от показателей в ЛЦ селезенки и тимуса. Клетки, свободно циркулирующие в кровеносном русле, имеют наиболее высокую степень защиты и регуляции процессов ПОЛ. Крайне низкая обеспеченность антиокислительными ферментами характерна для ЛЦ тимуса. Развитие иммунного ответа на тимусзависимый антиген сопровождается изменениями антиоксидантных механизмов регуляции функций лимфоцитов.

АНТИМИКОБАКТЕРИАЛЬНАЯ АКТИВНОСТЬ БАКТЕРИОЦИНОВ И ИХ КОМПЛЕКСОВ С ЛИПОСОМАМИ

Сосунов В.В., Мищенко В.В., Майоров К.Б., Ерусланов Б.В., Светоч В.А., Шакина Ю.Н., Селищева А.А., Апт А.С.

ГУ ЦНИИ туберкулеза РАМН, лаборатория иммуногенетики, Москва

Бактериоцинами называют вырабатываемые лактобактериями короткие пептиды длиной 20-60 аминокислотных остатков, обладающие антимикробной активностью. Предполагается, что с помощью секреции бактериоцинов лактобактерии подавляют рост близкородственных бактерий, находящихся рядом. Бактерицидное действие большинства бактериоцинов основано на разрушении ими мембраны клетки-мишени.

Нами были выделены и охарактеризованы несколько бактериоцинов, продуцируемых *Lactobacteriaceae sp.* Для определения антимикробной активности выделенных пептидов были использованы три экспериментальные системы: 1) чистая *in vitro* культура *M. tuberculosis*; 2) микобактерии, культивируемые совместно с перитонеальными макрофагами мышей; 3) модель экспериментального туберкулеза у мышей *in vivo*. Рост микобактерий оценивали методом, основанным на включении бактериями [³H]-урацила, а также методом высева на твердые среды с последующим подсчетом колоний. Было продемонстрировано, что низкие концентрации бактериоцинов эффективно подавляют рост микобактерий *in vitro*, но не влияют на рост микобактерий внутри макрофагов. Для доставки пептидов в макрофаги нами был получен ряд бактериоцин-липосомальных комплексов, некоторые из которых оказались способными подавлять рост микобактерий внутри макрофагов. Кроме того, нами было показано, что лечение инфицированных *M. tuberculosis* мышей некоторыми бактериоцин-липосомальными комплексами увеличивает время жизни этих мышей по сравнению с нелечеными мышами. Таким образом, полученные результаты позволяют предполагать, что бактериоцины могут являться потенциальными препаратами для лечения туберкулеза.

ИЗУЧЕНИЕ МЕХАНИЗМОВ, ЛЕЖАЩИХ В ОСНОВЕ ИЗМЕНЕНИЙ ФЕНОТИПА МОНОНУКЛЕАРНЫХ ФАГОЦИТОВ ПРИ ТРАНСЭНДОТЕЛИАЛЬНОЙ МИГРАЦИИ

Старикова Э.А., Чернова А.А., Соколов Д.И., Фрейдлин И.С.

ГУ НИИ экспериментальной медицины РАМН, Санкт-Петербург, Россия

Мононуклеарные фагоциты обладают высокой пластичностью. После миграции в ткани они дают начало различным типам клеток, которые определяют ход развития воспаления и иммунного ответа. Трансэндотелиальная миграция — один из важнейших процессов, влияющих на дифференцировку мононуклеарных фагоцитов. Ранее нами и другими исследователями было показано, что миграция мононуклеарных фагоцитов через монослой эндотелиальных клеток сопровождается изменениями поверхностного фенотипа этих клеток. С одной стороны, эти изменения могут быть результатом взаимодействия

поверхностных молекул эндотелия с их лигандами на моноцитах, с другой — результатом влияния секреторных продуктов этих клеток.

Цель нашего исследования состояла в изучении механизмов, лежащих в основе изменения фенотипа мононуклеарных фагоцитов при трансэндотелиальной миграции.

Мы проводили сравнительную оценку фенотипа моноцитоподобных клеток линии ТНР-1 после совместного бесконтактного культивирования с эндотелиальными клетками линии EA.hy 926 и после трансэндотелиальной миграции клеток ТНР-1 в тех же условиях. Уровень экспрессии поверхностных молекул оценивали с использованием проточной цитофлюориметрии.

Для изучения влияния секреторных продуктов клеток в кокультуре на фенотип клеток ТНР-1 использовали модифицированные камеры Бойдена с диаметром пор 1 мкм, допускающим свободный обмен веществ между клетками, но препятствующим их непосредственному контакту друг с другом. В верхнюю камеру помещали эндотелиальные клетки, а в нижнюю — клетки ТНР-1. Такой способ культивирования условно обозначили как «бесконтактный».

Наши исследования показали, что совместное бесконтактное культивирование эндотелиальных и моноцитоподобных клеток приводило к достоверному по сравнению с интактными клетками усилению уровня экспрессии адгезионных молекул CD11b, FcγR — CD16 и CD32 и рецептора LPS — CD14.

Для моделирования процесса трансэндотелиальной миграции использовали модифицированные камеры Бойдена с диаметром пор 8 мкм. Уровни экспрессии исследуемых поверхностных молекул на клетках ТНР-1, прошедших трансэндотелиальную миграцию, были достоверно выше, чем уровни экспрессии тех же молекул на клетках ТНР-1 при совместном бесконтактном культивировании с эндотелиальными клетками. Трансэндотелиальная миграция сопровождалась дополнительно достоверным повышением уровня экспрессии молекул главного комплекса гистосовместимости II класса HLA-DR.

Наши исследования показали, что за изменения фенотипа моноцитов при трансмиграции отвечают не только контактные взаимодействия мигрирующих клеток с эндотелиальными клетками, но также секреторируемые в этой системе вещества.

Исследование поддержано грантом РФФИ № 06-04-48110.

ИССЛЕДОВАНИЕ РЕЦЕПТОРОВ VEGF НА КЛЕТКАХ ИММУННОЙ СИСТЕМЫ МЫШЕЙ МЕТОДОМ ПРОТОЧНОЙ ЦИТОМЕТРИИ

Степанова О.И., Соколов Д.И., Крылов А.В., Киселёва Е.П.

НИИ экспериментальной медицины РАМН, Санкт-Петербург, Россия

Действие фактора роста эндотелия сосудов (VEGF) осуществляется через тирозинкиназные рецепторы VEGFR-1 (Flt-1) и VEGFR-2 (Flk-1) и хорошо изучено на клетках эндотелия сосудов. На клетках иммунной системы также обнаружены рецепторы VEGF. Ранее нами был прове-

ден сравнительный анализ экспрессии мРНК рецепторов VEGF в клетках иммунной системы мыши. Был показан синтез мРНК VEGFR-1 и VEGFR-2 в клетках перитонеального экссудата и макрофагах, синтез VEGFR-2 и отсутствие синтеза VEGFR-1 в клетках лимфоузлов [Крылов А.В., Степанова О.И., 2006]. Роль рецепторов VEGF на клетках иммунной системы не вполне ясна. Считается, что через них опосредуется хемотактическая активность VEGF.

Целью настоящего исследования является изучение экспрессии рецепторов VEGF на мембране интактных клеток иммунной системы мыши и при воздействии на них VEGF *in vitro*.

В качестве объектов исследования были взяты макрофаги и лимфоциты лимфоузлов. Макрофаги получали из клеток перитонеального экссудата путем отмывания от неприлипших к пластику клеток после культивирования в течение 20 ч, лимфоциты – из паховых лимфатических узлов. Анализ проводили на проточном цитофлуориметре EPICS ALTRA (Beckmann Coulter). В работе использовали следующие моноклональные антитела к антигенам мыши: F4/80 (Mac 1), меченые Алекса флюором (Caltag laboratories); B220 и CD3, меченые ФИТЦ (BD Pharmingen). VEGFR-1 выявляли при помощи непрямого метода иммунофлюоресценции с последовательным использованием крысиных антител против VEGFR-1 мыши (R&D Systems) и антикрысиного IgG, меченого фикоэритрином. VEGFR2 определяли по взаимодействию с анти-VEGFR-2 антителами, мечеными фикоэритрином (BD Pharmingen). Для каждого антитела использовался соответствующий изотип-контроль. Клетки инкубировали с антителами в течение 45 минут на льду, отмывали от избытка антител буфером, содержащим 1% фетальной сыворотки и анализировали на проточном цитофлуориметре.

Результаты исследований показали, что суспензия клеток лимфоузлов содержит 11,5% В-лимфоцитов и 81% Т-лимфоцитов. Среди CD3⁺-клеток 1% экспрессируют VEGFR-2, среди B220⁺-клеток 5-10% клеток экспрессируют VEGFR-2. Среди F4/80⁺-макрофагов перитонеального экссудата до 70% экспрессируют VEGFR-1 и 35-60% – VEGFR-2. При инкубации клеток перитонеального экссудата в присутствии 50 нг/мл VEGF в течение 20 ч наблюдали усиление экспрессии обоих рецепторов на мембране макрофагов. Полученные результаты коррелируют с полученными ранее данными об усилении экспрессии мРНК рецепторов VEGF при инкубации с этим же фактором.

Работа поддержана грантом РФФИ № 06-04-48250.

ОПЫТ ИЗУЧЕНИЯ РЕАКЦИЙ ВРОЖДЕННОГО ИММУНИТЕТА МИДИИ

Сухачев А.Н., Дьячков И.С., Кудрявцев И.В., Полевщиков А.В.

ГУ НИИ экспериментальной медицины РАМН, Санкт-Петербург, Россия

В настоящее время изучение взаимодействия паразит–хозяин является актуальным и широко востребованным, что вызвано существенным медицинским и ветеринарным значением. В качестве модели нами была выбрана система моллюск – трематода (*Mytilus edulis* и *Hymasthla elongata*). **Целью** работы являлось изучение основных па-

раметров клеточных реакций врожденного иммунитета мидии *Mytilus edulis* в отсутствие паразитарной инвазии.

Для определения качественного состава циркулирующих клеток использовался метод проточной цитометрии. Для оценки способности гемоцитов *M. edulis* к продукции активных форм кислорода был использован тест восстановления нитро-синего тетразолия (НСТ-тест) в спонтанной и зимозан-стимулированной модификациях. Фагоцитарная активность гемоцитов определялась при помощи реакции поглощения нейтрального красного и с использованием проточной цитометрии (поглощение меченых ФИТЦ бактерий *E. coli*). Для изучения гемолитической активности фракций циркулирующих клеток *M. edulis* была использована модификация метода безгелевой реакции локального гемолиза по Н.К. Эрне. В качестве клеток-мишеней использовались как интактные, так и опсонизированные различными лектинами эритроциты человека (ЭЧ). Были подобраны концентрации лектинов, обладавшие субагглютинирующим и сублизирующим действием по отношению к ЭЧ. Далее оценивали способность гемоцитов *M. edulis* к лизису ЭЧ, покрытых лектинами. Параллельно исследовалась способность гемоцитов, предобработанных лектинами, к лизису нативных ЭЧ. Сравнивались эффекты лектинов в отношении нативных и десализированных ЭЧ при культивировании с гемоцитами мидии.

Показано, что циркулирующие клетки подразделяются как минимум на две популяции, различающиеся по размерам и степени гранулярности. Фагоцитарной активностью по отношению меченых ФИТЦ бактерий обладало примерно 43% циркулирующих клеток. Помимо бактерий гемоциты моллюска были способны поглощать частицы замозана, что приводило к 30% повышению уровня продукции активных форм кислорода в зимозан-индуцированном НСТ-тесте. В то время как при внесении в культуру ЛПС изменений в метаболической активности клеток зарегистрировать не удалось. Сходные данные были получены при оценке способности гемоцитов к поглощению нейтрального красного, когда внесение частиц замозана вызывало 32% усиление эндоцитоза, а ответ на ЛПС отсутствовал. При исследовании гемолитической активности гемоцитов установлено, что обработка ЭЧ лектинами картофеля, сои, пшеницы, бузины черной, арахиса и виноградной улитки усиливала разрушение ЭЧ гемоцитами, в то время как обработка ЭЧ ФГА и ConA не влияла на этот процесс или даже, как в случае лектинов чечевицы и гороха, тормозила его. Предварительная обработка гемоцитов лектинами приводила к снижению литических свойств этих клеток, что указывает на возможность экранирования лектинами клеточных рецепторов. Десализация ЭЧ при помощи раствора трипсина вела к снижению литической активности клеток по отношению к этим ЭЧ. В качестве контроля использовались интактные ЭЧ, сохранявшие полный набор углеводных молекул в гликокаликсе. Полученные данные указывают на углеводную природу детерминант, которые распознаются гемоцитами мидий на поверхности клеток-мишеней. Сходную картину дала предварительная оценка числа зон гемолиза в лунках.

Полученные данные подтвердили, что гемоциты мидий обладают фагоцитарной активностью и способны к продукции активных форм кислорода, равно как и к поглощению коллоидных частиц нейтрального красного. На основании результатов проточной цитометрии и анализа литературы предполагается, что только одна из популяций циркулирующих клеток способна к фагоцитозу (агранулярные промежу-

точные клетки), тогда как у остальных популяций гемоцитов способность к фагоцитозу или эндоцитозу менее выражена. Важным представляется установленный факт усиления кислородного метаболизма и эндоцитоза под действием только корпускулярных, а не растворимых стимуляторов, причины которого остаются неясными. Гемоциты мидии обладают цитотоксической активностью в отношении ЭЧ, ключевое место в распознавании клеток-мишеней, по-видимому, играют углеводные детерминанты. В противопаразитарных реакциях сочетаются две стратегии защиты: одна, связанная с изоляцией паразита, другая — направленная на его элиминацию, которые осуществляются разными популяциями гемоцитов и/или требуют их кооперации.

Работа поддержана грантом РФФИ № 07-04-00084.

ВЛИЯНИЕ НИЗКОИНТЕНСИВНОГО ЛАЗЕРНОГО ИЗЛУЧЕНИЯ НА ЦИТОКИНОВУЮ АКТИВНОСТЬ МАКРОФАГОВ И НЕЙТРОФИЛОВ *IN VITRO* ПРИ ФАГОЦИТОЗЕ БАКТЕРИЙ

Тихомирова Е.И.¹, Тучина Е.С.¹, Рудик Д.В.¹, Емельянова Н.В.², Водянова Т.В.²

¹Саратовский государственный университет им. Н.Г. Чернышевского, г. Саратов, Россия

²Саратовский государственный медицинский университет, г. Саратов, Россия

Исследование механизмов, лежащих в основе всего многообразия эффектов, оказываемых низкоинтенсивным лазерным излучением (НИЛИ) на организм, является актуальным и имеет большое значение как для фундаментальной науки, так и для медицинской практики. В отношении влияния НИЛИ на процесс фагоцитоза и функциональное состояние фагоцитирующих клеток до сих пор многое остается невыясненным. Ранее нами было установлено, что инфракрасное (ИК) НИЛИ с длиной волны 850 нм стимулирует завершенность процесса фагоцитоза бактерий макрофагами и нейтрофилами. Показана взаимосвязь этого эффекта с одновременной активизацией механизмов адгезии и киллинга бактерий в фагоцитах.

Цель работы: изучить влияние ИК НИЛИ, генерируемого полупроводниковыми лазерными диодами, *in vitro* на цитокиновую активность макрофагов и нейтрофилов в процессе фагоцитоза бактерий.

Материалы и методы. Нейтрофилы выделяли из периферической гепаринизированной крови здоровых добровольцев, а макрофаги — из перитонеального экссудата самцов беспородных белых мышей по общепринятым методикам и использовали при моделировании *in vitro* процесса фагоцитоза бактерий *Staphylococcus aureus* 209-P. Облучение макрофагов и нейтрофилов осуществляли до начала фагоцитоза с помощью лазерного диода с максимумом спектра испускания 850 нм, дозы излучения составили 300, 900 1500 мДж. Содержание основных провоспалительных и регуляторных цитокинов: ИЛ-1, ИЛ-4, ИЛ-8, ФНО α и ИФН γ определяли через 3 и 6 ч процесса фагоцитоза в супернатанте среды культивирования фагоцитов, подвергнутых облучению НИЛИ, методом ИФА с коммерческими тест-системами на основе моноклональных антител к исследуемым цитокинам (ООО «Цитокин», Санкт-Петербург; НПО ЗАО «Вектор-БЕСТ», г. Новоси-

бирск). В качестве контроля использовали показатели содержания цитокинов в супернатанте среды культивирования фагоцитирующих клеток, не подвергнутых действию НИЛИ.

Результаты. При оценке влияния ИК НИЛИ установлена индукция синтеза основных провоспалительных цитокинов ИЛ-1 и ФНО α . Показано дозозависимое увеличение содержания ИЛ-1 через 3 ч инкубации макрофагов с бактериями по сравнению с контролем. Отмечено, что ИК НИЛИ оказывало значительное стимулирующее влияние на синтез ФНО α , наибольшее содержание которого отмечено при действии дозой 1500 мДж/см² по сравнению с контролем. Выявлены достоверные различия в концентрации ФНО α через 3 и 6 ч фагоцитоза при действии на макрофаги дозами 900 и 1500 мДж/см². Концентрация ИФН γ увеличивалась в среднем в 1,5 раза по сравнению с контролем, однако это увеличение не имело дозозависимый характер. Статистически значимые различия содержания ИЛ-4 в культуральной среде с облученными и необлученными фагоцитирующими макрофагами не были обнаружены при действии всех испытываемых доз излучения. Отмечено увеличение синтеза ИЛ-8 фагоцитирующими макрофагами только через 3 ч процесса фагоцитоза.

Анализ цитокиновой активности нейтрофилов человека при действии ИК НИЛИ (850 нм) позволил выявить достоверное увеличение содержания ИЛ-1 к 3 и 6 ч процесса фагоцитоза под влиянием всех испытываемых доз по сравнению с контролем. При этом наиболее выраженное действие оказывала доза 900 мДж/см², вызывающая индукцию синтеза цитокинов к 6 ч фагоцитоза. Аналогичные данные были получены и по содержанию ФНО α . Следует отметить, что нейтрофилы синтезировали ФНО α более активно, чем макрофаги при тех же условиях эксперимента. Оценка продукции ИФН γ нейтрофилами показала достоверное повышение его содержания к 3 ч, и более выраженное — к 6 ч фагоцитоза бактерий по сравнению с контролем независимо от дозы излучения. Установлено достоверное снижение синтеза ИЛ-4 при действии всех изученных доз через 3 и 6 ч фагоцитоза бактерий по сравнению с контролем. На фоне действия НИЛИ (с дозами 300 и 900 мДж/см²) достоверных различий синтеза ИЛ-8 через 3 ч фагоцитоза с контрольным значением выявлено не было. При действии дозы 1500 мДж/см² отмечено увеличение его содержания. К 6 ч фагоцитоза бактерий показано достоверное снижение содержания ИЛ-8 при действии всех испытываемых доз излучения по сравнению с контролем.

Таким образом, установлен дозозависимый эффект влияния ИК НИЛИ (850 нм) на синтез ИЛ-1, ФНО α и ИФН γ в процессе фагоцитоза бактерий нейтрофилами человека, и дозозависимый — на синтез ИФН γ и ИЛ-8 макрофагами белых мышей.

РОЛЬ АКТИВНЫХ ФОРМ КИСЛОРОДА В Th1/Th2-ПОЛЯРИЗАЦИИ ИММУННОГО ОТВЕТА

Ткачев В.О., Перминова О.М., Вольский Н.Н., Кудяева О.Т., Козлов В.А.

ГУ НИИ клинической иммунологии СО РАМН, г. Новосибирск, Россия

В настоящее время активные кислородные метаболиты (АКМ) широко исследуются в качестве молекул, участву-

ющих в функционировании внутриклеточных сигнальных цепей. Показано влияние внутриклеточного окислительно-восстановительного потенциала на процессы транскрипции и трансляции, а также прямое воздействие АКМ на широкий круг других клеточных функций, в том числе обсуждается их возможная роль в поддержании Th1/Th2-баланса и в поляризации иммунного ответа.

Целью данного исследования было изучение параметров кислородного метаболизма клеток иммунной системы в ходе иммунопатологического процесса, спонтанно развивающегося по двум альтернативным вариантам: либо как Th1-, либо как Th2-зависимая реакция.

В качестве экспериментальной модели использовались мыши, у которых индуцировалась хроническая реакция «трансплантат против хозяина» (РТПХ), протекающая, как показано ранее, по Th1- и Th2-зависимым вариантам. РТПХ вызывали переносом лимфоидных клеток от родителей гибридам первого поколения: DBA/2 → (C57Bl/6 x DBA/2)F1. О развитии аутоиммунного гломерулонефрита, характеризующего Th2-ассоциированный вариант РТПХ, судили по появлению стойкой протеинурии. Продукция АКМ оценивалась по результатам НСТ-теста (спонтанного и стимулированного продигозаном), а также по внутриклеточному содержанию перекиси водорода, определяемой стандартным флюоресцентным методом проточной цитометрии.

В первые 2-4 недели индукции РТПХ, когда, предположительно, происходит поляризация иммунного ответа и, соответственно, выбор пути, по которому будет развиваться иммунопатологический процесс, обнаружена активация спонтанной продукции супероксидного радикала в нейтрофилах периферической крови. В то же время на поздних стадиях у мышей с аутоиммунным гломерулонефритом, возникающим при Th2-зависимом варианте развития РТПХ, выявлено угнетение супероксид-продуцирующей системы этих клеток. Установлено, что дегидроэпиандростерон, способный направлять иммунный ответ в Th1-сторону и снижающий частоту развития гломерулонефрита у мышей в данной модели, подавляет кислородный метаболизм иммунокомпетентных клеток в опытах *in vivo* и *in vitro*. Однократное введение данного гормона мышам (в дозе, вызывающей Th1/Th2-переключение) снижает показатели НСТ-теста, а его добавление к культуре тимоцитов *in vitro* дозозависимо уменьшает в них содержание перекиси водорода, накопление которой ведет к массовому апоптозу тимоцитов. Учитывая, что дегидроэпиандростерон, действуя на этапе индукции РТПХ, способен снижать продукцию АКМ клетками иммунной системы, естественно предположить, что его антиоксидантный эффект может лежать в основе его влияния на Th1/Th2-переключение.

Полученные данные свидетельствуют в пользу существования тесной взаимосвязи между процессами в иммунной системе, детерминирующими развитие различных вариантов ее реагирования на внешние воздействия, и активностью АКМ-продуцирующих систем иммунокомпетентных клеток. Благодаря этому физиологические агенты и лекарственные препараты, влияющие на активность АКМ-продуцирующих ферментов, могут быть использованы в качестве иммуномодулирующих средств, способных целенаправленно воздействовать на ключевые этапы иммунопатогенеза различных заболеваний, связанных со сдвигами Th1/Th2-баланса. Результаты работы подтверждают предположение о важной роли кислород-

ных метаболитов не только как эффекторных агентов, участвующих в альтерации тканей, но и как регуляторных молекул, влияющих на Th1/Th2-поляризацию иммунного ответа.

ЦИТОКИНЫ ПРИ ЯЗВЕННОМ ПОРАЖЕНИИ СЛИЗИСТОЙ ОБОЛОЧКИ ГАСТРОДУОДЕНАЛЬНОЙ ЗОНЫ У КРЫС

Трубицына И.Е., Чикунова Б.З., Дроздов В.Н.

ЦНИИ гастроэнтерологии, Москва, Россия

Используя «ацетатную» язву желудка/двенадцатиперстной кишки или ввода животным нестероидные противовоспалительные препараты (НПВП), воспроизводят воспалительно-деструктивные поражения слизистой оболочки (СО) гастродуоденальной зоны (ГДЗ). Механизмы развития повреждений СО ГДЗ разные, но в любом случае происходит комплексное нарушение центральных и местных регуляторов.

Цель: сравнительное комплексное изучение содержания цитокинов (ЦК), ацетилхолин (Ах) и серотонина (5НТ) при разных моделях воспроизведения поврежденной СО ГДЗ.

Материал, методы и обсуждение. Экспериментальное воспроизведение поврежденной СО ГДЗ проводили на 50 белых крысах обоего пола, масса тела 180-220 г. В крови и экстрактах слизистой определяли IL-1 β , IL-4, IFN γ , TNF α иммуноферментным методом, биохимическим – 5НТ и Ах.

«Ацетатная» язва – значительное повышение содержания 5НТ и Ах (на 200-400%) с первых минут и часов как в крови, так и в ткани, которое предшествует изменениям цитокинов, наступающим через 36-48 ч, концентрация IFN γ увеличивается с 40 \pm 8 до 480 \pm 60 пг/мл, TNF α до 120 \pm 20 пг/мл. Через 72 ч возрастает содержание IL-4 до 235 \pm 30 пг/мл. Механизм формирования НПВП-ассоциированных повреждений СО иной – повышению 5НТ и Ах предшествует повышение цитокинов, уровень которых первоначально повышается в крови, затем в СО тонкой кишки. Содержания 5НТ и Ах менее значительно – на 50-100%. Экспериментальные исследования на животных дали возможность проследить процесс образования повреждений в СО ГДЗ и выявить особенности развития воспалительно-деструктивных процессов при введении НПВП. Кроме нарушения синтеза простагландинов, снижения защитных свойств СО ГДЗ, одновременно повышается цитокиновый статус СО. Полученные данные уточняют патогенетические механизмы указанных заболеваний.

АКТИВАЦИЯ ПЕНТРАКСИНАМИ ФАКТОРА NF- κ B В КЛЕТКАХ COLO320HSR, ЛИШЕННЫХ Fc γ -РЕЦЕПТОРОВ

Трулев А.С., Орлов С.В., Перевозчиков А.П., Назаров П.Г.

Институт экспериментальной медицины РАН, Санкт-Петербург, Россия

Пентраксины представляют собой группу белков с циклической пентамерной структурой и гомоло-

гией аминокислотной последовательности. Главные представители этого семейства – С-реактивный белок (CRP) и сывороточный Р-компонент амилоида (SAP). Они способны опсонизировать бактерии, связывать ядерные антигены апоптотических и некротизированных клеток, тем самым препятствуя их накоплению в тканях и индукции аутоиммунных реакций. У человека регуляция экспрессии генов CRP и SAP происходит по-разному. Концентрация CRP в сыворотке крови в норме невелика, но многократно возрастает в острой фазе воспаления (с 5 до 200 мкг/мл и выше). Для SAP характерна конституциональная экспрессия на уровне 30 мкг/мл и умеренное повышение продукции при воспалении. Пентраксины не только служат опсонинами и усиливают фагоцитоз своих лигандов, но активируют в иммунокомпетентных клетках и эндотелии синтез цитокинов, адгезионных молекул, экспрессию iNOS и другие процессы, зависящие от NF-κB [Kawanami D. et al., 2005; Jai Won Chang et al., 2005]. Рецепторами для обоих пентраксинов могут служить FcγR (FcγRI, FcγRII, FcγRIII) [Du Clos T.W. et al., 2001; Bang R. et al., 2005], хотя это подтверждается не всеми авторами [Saeland E. et al., 2001; Hundt M. et al., 2001].

Транскрипционный фактор NF-κB является важным звеном в запуске экспрессии генов, участвующих в реакциях врожденного и приобретенного иммунитета. NF-κB располагается в цитоплазме в неактивном комплексе с I-κB. Под действием активационного сигнала происходит фосфорилирование I-κB и распад комплекса. После чего NF-κB транслоцируется в ядро, связывается с ДНК и активирует экспрессию генов, вовлеченных в воспаление [Bouwmeester T. et al., 2004]. Фактор NF-κB участвует в активации клеток через Fcγ-рецепторы [Banki Z. et al., 2003].

Поскольку пентраксины участвуют в воспалении, нас интересовало влияние представителей этого семейства на активность транскрипционного фактора NF-κB. Для этого мы трансфецировали клетки карциномы ободочной кишки COLO320HSR плазмидой, содержащей ген люциферазы под минимальным промотором, сцепленным с пятью цис-элементами для NF-κB. Линия COLO320HSR была выбрана потому, что на ее клетках отсутствуют рецепторы FcγRI и FcγRII [Orlov S.V. et al., 2002; Issakov D.V. et al., 2002]. Трансфекцию производили в 24-луночных планшетах (Sarstedt; 200 тыс. клеток на лунку) при помощи реагента Lipofectamine2000 (Invitrogen). Комплексы готовили путем смешивания ДНК с Lipofectamine2000 в соотношении 1:2,5 и инкубации в течение 20 минут и добавляли к клеткам (по 0,8 мкг ДНК на лунку). На следующий день в лунки с трансфецированными клетками добавляли препараты, исследуемые на способность активировать NF-κB, о чем судили по усилению экспрессии гена люциферазы. Следующие препараты исследовали на способность активировать NF-κB: SAP (Calbiochem) и CRP человека (MP Biomedicals) в концентрациях от 10 до 100 мкг/мл, моноклональные антитела к CD16 человека (FcγRIII), агрегированный IgG человека (63°C, 10-минут) (в концентрациях от 10 до 100 мкг/мл), рекомбинантный TNFα человека. Инкубацию клеток проводили в течение 24 ч. Затем клетки промывали забуференным фосфатами физиологическим раствором NaCl (PBS), собирали и лизировали буфером, содержащим 10 мМ Трис-HCl, pH 7,6, 50 мМ NaCl и 0,25% Triton X-100.

Исследование клеток COLO320HSR с помощью точной цитометрии, проведенное в рамках настоящей работы, дало дополнительную информацию об отсутствии на них Fc-рецепторов, показав, что эти клетки не связывают также антитела к CD16, т.е. не экспрессируют и низкоаффинные FcγRIII рецепторы. Т.о. использованные клетки линии COLO полностью лишены известных Fcγ-рецепторов. Результаты исследования показали, что препараты, способные связываться с Fc-рецепторами и вызывать их перекрестную сшивку, не активировали промотор NF-κB в трансфецированных клетках. «Неактивными» были агрегированный IgG, моноклональные антитела к низкоаффинному Fcγ-рецептору CD16 и CRP человека. Полученные данные согласуются с точкой зрения, согласно которой пентраксины, в частности CRP, могут нуждаться в наличии FcγR на поверхности клеток для их активации. В отличие от CRP, другой пентраксин, SAP, оказывал выраженное и достоверное стимулирующее влияние на активность NF-κB и экспрессию люциферазы в отсутствие FcγR, что указывает на существование FcγR-независимого пути его воздействия на клетки. NF-κB был высоко чувствителен к активации провоспалительным цитокином TNFα, который оказывал на него сильное стимулирующее действие (положительный контроль). Вопрос о рецепторах, используемых пентраксинами CRP и SAP для активации клеток, требует дальнейшего изучения.

Исследование поддержано грантом РФФИ № 06-04-49629.

ОБРАЗОВАНИЕ АНТИТЕЛ РАЗЛИЧНОЙ СПЕЦИФИЧНОСТИ ЗАВИСИТ ОТ СПОСОБА ВВЕДЕНИЯ КОМБИНИРОВАННОЙ ВАКЦИНЫ ПРОТИВ ВИЧ-1

Ужаченко Р.В., Карпенко Л.И., Бажан С.И., Лебедев Л.Р., Ильичев А.А.

ФГУН ГНЦ ВБ «Вектор», п. Кольцово, Новосибирская область, Россия

Поиск профилактических средств против ВИЧ-инфекции все еще остается открытой проблемой современной биомедицины несмотря на большое число иммуногенов, предложенных в качестве анти-ВИЧ-вакцины. В то же время немаловажным аспектом решения данной задачи является поиск новых адъювантов, оптимальных стратегий иммунизации, способов доставки, а также путей введения с целью повысить иммуногенный потенциал кандидатной вакцины. Необходимость изучения данных параметров иммунизации, в т.ч. способа введения вакцины напрямую связана с эффективностью вакцины.

В настоящей работе была изучена комбинированная анти-ВИЧ-вакцина (КомбиВИЧвак), полученная на основе двух полиэпитопных белков: ТВ1 (T- and B-cell immunogene), содержащего Т-хелперные и В-клеточные эпитопы из белков *env* и *gag*, и ТС1 (T-cell immunogene), в котором представлены антигенные детерминанты для цитотоксических Т-лимфоцитов и Т-хелперов. КомбиВИЧвак получена в форме вирусоподобных частиц, поверхность которых содержит белок ТВ1, а коровая часть представлена ТС1 в форме ДНК-вакцины.

Цель работы: изучить специфичность гуморального ответа на КомбиВИЧвак при различных путях введения

вакцины: внутримышечном (в/м), внутривенном (в/в) и подкожном (п/к).

Для иммунизации были использованы мыши линии Balb/c весом 15 г. Животным вводили одну дозу КомбиВИЧвак двукратно с интервалом через 2 недели. Для определения титра антител к ВИЧ-1 в сыворотках иммунизированных мышей был использован непрямой ИФА. Специфичность анти-ВИЧ-IgG, образующихся при вакцинации КомбиВИЧвак, была исследована методом иммуноблотинга с применением тест-системы «Блот-ВИЧ1/2+0» для выявления антител к антигенам ВИЧ-1 и -2.

В данном исследовании было показано, что как при в/м, так в/в и п/к введениях КомбиВИЧвак наблюдалось появление IgG, специфичных к антигенным детерминантам в составе ТВ1, ТС1, а также белков ВИЧ-лизата и тест-системы. При этом наибольшая величина титра достигала в случае внутримышечной инъекции КомбиВИЧвак (1:640 000).

При изучении связывания антител, формирующихся в ответ на вакцину, с отдельными вирусными белками было показано, что при различных путях введения КомбиВИЧвак наблюдается образование IgG с неодинаковой специфичностью. Так, при в/м инъекции антитела были gag-специфичными и практически не взаимодействовали с *env*. В то же время в случае в/в инъекции IgG связывались как с gag (46% антител), так и gp120 (18%) и gp41 (36%). П/к введение КомбиВИЧвак сопровождалось появлением IgG, которые были положительно иммунореактивны преимущественно с белками *env* (41% и 49% для gp120 и gp41 соответственно), и лишь небольшая фракция IgG была gag-специфичной (10%). При этом картина связывания IgG1 и IgG2a с белками *env* и gag ВИЧ-1 была аналогична полученной для IgG.

Помимо формирования гуморального ответа, КомбиВИЧвак индуцировала образование Т-клеток памяти, что регистрировалось при помощи теста ELISpot. При в/м введении вакцины количество ВИЧ-специфических Т-лимфоцитов было несколько выше, чем в случае п/к инъекции.

Таким образом, КомбиВИЧвак вызывает образование антител различной специфичности в зависимости от способа введения вакцины: при в/м инъекции IgG являются gag-специфичными, в/в – gag- и *env*-иммунореактивными, а п/к введении – преимущественно *env*-специфичными. Исходя из полученных данных, наиболее оптимальным для человека является подкожный способ введения кандидатной против ВИЧ-1 КомбиВИЧвак.

ВЛИЯНИЕ ПОЛИСАХАРИДА POTAMOGETON PERFOLIATUS IN VITRO НА АКТИВНОСТЬ ФАГОЦИТОЗА И ИНДУКЦИЮ ЦИТОКИНОВ МАКРОФАГАМИ

Фомина А.А.¹, Фучеджи О.А.², Коннова С.А.¹, Тихомирова Е.И.¹

¹ Саратовский государственный университет им. Н.Г. Чернышевского, г. Саратов, Россия

² Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов РАН, г. Саратов, Россия

В настоящее время в медицинской практике широко используются препараты растительных полисахаридов

(ПС) в качестве иммуномодуляторов (например, альгинаты бурых водорослей). Многие уже применяющиеся биологически активные добавки, обладающие способностью регулировать иммунные процессы в организме человека, также содержат нетоксичные растительные ПС. Однако поиск новых эффективных иммуностимулирующих препаратов, особенно среди ПС высших растений, является актуальной задачей. В этом плане представляет интерес исследование ПС широко распространенных высших водных растений, в частности минорных гетерополисахаридов рдеста пронзеннолистного – типичного обитателя мелководий Волги.

Целью исследования было изучение влияния нейтрального полисахарида (н-ПС-1) *Potamogeton perfoliatus in vitro* на активность фагоцитоза эшерихий и индукцию провоспалительных эндогенных цитокинов макрофагами.

Перитонеальные (ПМФ) и альвеолярные (АМФ) макрофаги выделяли из организма беспородных белых мышей-самцов по общепринятой методике и использовали для моделирования процесса фагоцитоза. В качестве объекта фагоцитоза использовали суточную культуру *Escherichia coli* Ca 52 из коллекции Фридерика. Препарат ПС добавляли в инкубационные пробирки в концентрации 0,01; 0,1 и 1 мкг/мл непосредственно перед внесением бактериальных клеток. Фагоцитарные индексы (ФИ) и индексы завершенности фагоцитоза (ИЗФ) определяли через 0,5, 1, 2, 4 и 6 ч инкубации макрофагов с бактериями. Содержание цитокинов (ИЛ-1, ФНО α) анализировали в супернатанте иммуноферментным методом с тест-системами на основе моноклональных антител производства ООО «Цитокин» (Санкт-Петербург).

Исследованный н-ПС-1 – гетерополисахарид с молекулярной массой 20 кДа, содержащий рамнозу, фукозу, глюкозу, маннозу, галактозу и глюкозамин. Разнообразный моносахаридный состав позволяет предположить возможность взаимодействия этого гликополимера с соответствующими рецепторами на фагоцитах.

Добавление н-ПС-1 в концентрации 0,01 мкг/мл в культуру макрофагов приводило к незначительному увеличению количества активированных клеток по сравнению с контролем в интервале 1–4 ч фагоцитоза (на 10% для АМФ и на 15–18% для ПМФ), к 6 ч значения ИФ соответствовали контрольным. Препарат в дозе 0,1 мкг/мл усиливал по сравнению с контролем активность только АМФ на 11 и 13% к 2 и 6 ч процесса фагоцитоза соответственно. Внесение н-ПС-1 в дозе 1 мкг/мл приводило к значительной активации АМФ и ПМФ в течение всего процесса фагоцитоза. ФИ на всех этапах фагоцитоза *E. coli* были выше по сравнению с контролем для АМФ на 14–20%, а для ПМФ – на 23–33%. Динамика фагоцитоза эшерихий АМФ и ПМФ на фоне действия ПС в дозе 0,01 и 1 мкг/мл была сходной.

На основе фагоцитарных индексов были рассчитаны индексы завершенности фагоцитоза эшерихий макрофагами. Для ПМФ и АМФ эти индексы имели отрицательные значения при всех испытываемых дозах полисахаридов, как и в контроле. Полученные значения характеризовали процесс фагоцитоза *E. coli* Ca 52 как незавершенный.

В ходе исследования влияния препарата на индукцию синтеза цитокинов показано, что добавление н-ПС-1 в концентрации 0,01 мкг/мл в культуру макрофагов приводило к синтезу ИЛ-1 в пределах контроля. Препарат н-ПС-1 в дозах 0,1 и 1 мкг/мл существенно индуцировал

продукцию этого цитокина, и к 4, 6 и 12 ч концентрация ИЛ-1 повышалась в 5-10 раз по сравнению с контролем для АМФ и ПМФ. Содержание ФНО α в опытных пробах при всех исследуемых дозах ПС было выше в 2,5-5 раз по сравнению с контрольными значениями. Однако зависимость индукции ФНО α фагоцитирующими макрофагами от концентрации ПС не была выявлена.

Таким образом показано влияние н-ПС-1 рдеста пронзеннолистного *in vitro* на активность процесса фагоцитоза эшерихий и индукцию синтеза провоспалительных цитокинов – ИЛ-1 и ФНО α . На фоне действия ПС увеличивалась фагоцитарная активность макрофагов на стадии адгезии и образования фаголизосомы. Показано, что ПС усиливает синтез ИЛ-1 и ФНО α макрофагами. Однако это не сказывалось на завершенности процесса фагоцитоза бактерий. Данный факт позволяет предположить, что препарат не влияет на механизмы киллинга эшерихий. Изучение взаимодействия ПС *P. perfoliatus* с рецепторами на поверхности фагоцитов будет являться предметом дальнейших исследований.

Работа частично поддержана грантом РФФИ № 05-04-48123.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНО-МОРФОЛОГИЧЕСКОЕ ОБОСНОВАНИЕ ПРИМЕНЕНИЯ РАЗЛИЧНЫХ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ФОРМ МИЕЛОПИДА ПРИ БАКТЕРИАЛЬНЫХ ИНФЕКЦИЯХ

**Халилов М.А., Красников В.В., Ильина О.В.,
Молдованов И.А.**

*ГОУ ВПО «Орловский государственный университет»,
медицинский институт, г. Орел, Россия*

В последние годы показана высокая клиническая эффективность применения препаратов иммунорегуляторных пептидов при лечении различных бактериальных инфекций, в том числе при острых и хронических раневых процессах. Проведенные нами ранее экспериментальные исследования показали, что препарат миелопид (комплекс гетерологичных миелопептидов) обладает прямым антистафилококковым, антистрептококковым и антикандидозным действием. В настоящее время для пролонгирования действия лекарственных препаратов широко используются различные синтетические полимеры. В связи с этим **целью** исследования явилась разработка новых лекарственных форм миелопида на полимерной основе для применения их при инфекционных поражениях кожи и слизистых.

Эксперименты проводились на 140 крысах линии «Вистар» весом 110-130 г. Животные в зависимости от серии исследований и применяемого метода лечения были распределены по группам следующим образом: животные, не получавшие лечения (контрольная группа); животные групп сравнения (с применением раствора миелопида 1500 мкг/мл, иммобилизованного хлоргексидина биглюконата (0,02%) в аэросил-глицерине, аэросил-глицериновой основы, натрий-карбоксиметилцеллюлозы); основные группы животных, получавшие оптимизированное лечение с применением иммобилизованной формы миелопида в геле натрий – карбоксиметилцеллюлозы, иммобилизованной формы миелопида на аэросил-глицериновой основе. Фиксирование показателей и забор материала про-

изводили на 1, 3, 5, 7, 10, 14 сутки от лечения. Цитологическое исследование раневых мазков-отпечатков и гистологический анализ раневых биоптатов в динамике лечения показали, что наилучшие результаты в лечении гнойных ран были получены при использовании иммобилизованной формы миелопида как на аэросил-глицериновой основе, так и на основе натрий-карбоксиметилцеллюлозы (КМЦ). Фаза воспаления, выражающаяся в трансформации струпа, его демаркации, формировании грануляционной ткани, а также воспалительной инфильтрации подлежащих жизнеспособных тканей дна раны при применении иммобилизованных форм миелопида, сокращалась до трех суток, раствора миелопида – до пяти, а при лечении иммобилизованными формами хлоргексидина биглюконата и основами: натрий-КМЦ и аэросил-глицерина до 7-10 суток. У животных контрольной группы фаза воспаления составила 14 дней. С 3-х суток в сериях с использованием депонированных форм миелопида фиксировалась фаза регенерации, характеризующаяся развитием грануляционной ткани в виде отдельных островков на дне и стенках раны с заполнением всего дефекта раны к 5 суткам, а к 10-14 суткам были явно заметны признаки фазы реорганизации рубца и эпителия. В контрольной группе животных грануляционная ткань даже к 14 суткам полностью не выполняла раневой дефект. Следует отметить, что миелопид не оказывал повреждающего действия на грануляционную ткань. Кроме того, у животных основной группы монокультура золотистого стафилококка высевалась из ран только на 1-3 сутки, при применении указанных антисептиков и раствора миелопида – на 1-5 сутки, в контроле – даже на 14 сутки.

Таким образом, проведенные экспериментальные исследования показали преимущество применения в лечении гнойных ран иммобилизованных форм миелопида, что обеспечивает постоянное и постепенное высвобождение его в ране и тем самым пролонгирование антимикробного эффекта.

РОЛЬ В-ЛИМФОЦИТОВ В РЕГУЛЯЦИИ РЕПАРАТИВНОЙ РЕГЕНЕРАЦИИ ПЕЧЕНИ

Храмцова Ю.С., Юшков Б.Г., Озорнина К.А.

*Институт иммунологии и физиологии УрО РАН,
Уральский государственный университет
им. А.М. Горького, Екатеринбург, Россия*

На сегодняшний день доказано, что разные клетки иммунной системы принимают участие в регуляции регенерации. Однако данные, касающиеся участия В-лимфоцитов в этом процессе, немногочисленны. В связи с этим **целью** данной работы изучать роль В-лимфоцитов в регенерации печени крыс после частичной гепатэктомии.

Методы. Опыты проводились на беспородных крысах-самцах массой 180-230 г. Для исследования роли В-лимфоцитов нами был использован иммунокорректор – миелопид, который вводили однократно внутримышечно за 1 ч до оперативного вмешательства в дозе 0,06 мг/кг. Регенерацию печени индуцировали удалением 2/3 массы органа и оценивали по морфологическим и гистологическим показателям. Через 17 ч после воздействия из селезенки и тимуса готовили взвесь клеток в среде 199 по методу Краскиной Н.А. и трансплантировали реципиентам в хвостовую вену по 60-80 x 10⁶ клеток. Регене-

рационные процессы в печени у реципиентов изучали через 48 ч. Статистический анализ результатов проводили с использованием непараметрического критерия Манна-Уитни.

Результаты. Активация В-звена иммунной системы миелолиподом приводит к индукции клеточной регенерации в печени через 17 ч после частичной гепатэктомии. Об этом свидетельствует увеличение митотического индекса гепатоцитов (от $0,0005 \pm 0,0002\%$ в контроле до $2,33 \pm 0,66\%$). При этом наблюдается уменьшение размеров ядер (от $8,7 \pm 0,28$ мкм в контроле до $7,07 \pm 0,22$ мкм) и количества двуядерных клеток (от $17,75 \pm 1,03\%$ в контроле до $9,4 \pm 1,2\%$), т.е. снижается способность клеток печени к внутриклеточной регенерации. При адоптивном переносе спленоциты и тимоциты животных с активированным В-звеном вызывают у реципиентов сходные с донорами морфологические и гистологические изменения печени. Так, в печени реципиентов отмечается увеличение числа митозов (от $0,52 \pm 0,33\%$ в контроле до $2,00 \pm 0,71\%$) и снижение количества двуядерных клеток (от $21,75 \pm 1,79\%$ в контроле до $3,80 \pm 1,53\%$). При этом спленоциты и тимоциты доноров оказывают одинаковое воздействие на физиологическую регенерацию печени реципиентов.

Заключение. Активация В-звена иммунной системы миелолиподом приводит к ускорению клеточной регенерации печени, при этом снижается способность гепатоцитов к внутриклеточной регенерации. Скорее всего, В-лимфоциты выступают в роли клеток-регуляторов при взаимодействии Т-лимфоцитов и пролиферирующих клеток.

ВЛИЯНИЕ MIF, V-АНТИГЕНА И КОЛЛАГЕНА I ТИПА НА КОЛОНИЕОБРАЗОВАНИЕ И ПРОЛИФЕРАЦИЮ МУЛЬТИПОТЕНТНЫХ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТРОМАЛЬНЫХ КЛЕТОК КОСТНОГО МОЗГА В КУЛЬТУРЕ *IN VITRO*

Чайлахян Р.К., Герасимов Ю.В., Третьяков О.Ю., Смирнов Г.Б., Марков А.П., Сафоян А.А., Нестеренко В.Г., Суслов А.П.

ГУ НИИЭМ им. Н.Ф. Гамалеи РАМН

Размножение фибробластов в очаге воспаления, их активность в продукции металлопротеиназ (коллагеназ) — ключевой клеточный компонент воспалительного процесса. Важным направлением в изучении механизмов воспаления является моделирование этого процесса *in vitro*. В культуре ткани *in vitro* исследовали влияние белковых факторов разной природы: иммунорегуляторного, провоспалительного цитокина (MIF, macrophage migration inhibition factor), бактериального антигена (V-антиген, основной маркер вирулентности *Yersinia pestis*) и коллагена I типа (основной белок внеклеточного матрикса) на колониеобразование и пролиферацию мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток (ММСК) костного мозга. Показано, что все исследуемые белковые факторы воспаления действуют на формирование колониеобразующих единиц фибробластов (КОЕф) в культурах костного мозга крыс Wistar однонаправленно, в разной степени угнетая его: MIF и V-антиген слабо (на 18% и 11% соответственно), коллаген — более сильно (на 30-62%). При совместном применении белковые факторы проявляют аддитивный эффект: MIF+V-антиген снижают ко-

лониеобразование на 44%, MIF+коллаген — на 61-73%, а MIF+V-антиген+коллаген — на 79%. В то же время влияние исследуемых белковых факторов на размножение стромальных фибробластов костного мозга крыс в пассированных культурах было неоднозначным. Коллаген по-прежнему действовал угнетающе (подавление на 60%). V-антиген слабо стимулировал размножение фибробластов (на 15%). Эффекты же MIF зависели от концентрации этого цитокина — в концентрации 10 нг/мл MIF стимулировал размножение клеток на 30-51%, в концентрации 50 нг/мл — угнетал на 16-30%.

Таким образом, полученные данные указывают на наличие выраженных регуляторных эффектов MIF, V-антигена и коллагена I типа при их раздельном или совместном действии на колониеобразование и размножение ММСК в культуре *in vitro*. Эти эффекты могут быть, с одной стороны, однонаправленными, в виде подавления колониеобразования ММСК, или разнонаправленными — стимулирующими или ингибирующими в зависимости от фактора или его дозы — при их действии на пролиферацию ММСК.

ИНДУКЦИЯ ИНТЕРФЕРОНА ЧЕЛОВЕЧЕСКИМ СЫВОРОТОЧНЫМ γ -ГЛОБУЛИНОМ, МОДИФИЦИРОВАННЫМ КАТИОНАМИ МЕТАЛЛОВ

Чекнев С.Б., Бабаянц А.А., Денисова Е.А.

НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф. Гамалеи РАМН, Москва, Россия

Введение. Известно, что белки γ -глобулиновой фракции плазмы крови индуцируют выработку интерферона (ИФН). При этом активными оказываются не только полноразмерные молекулы антител, но и отдельные их фрагменты. Конформационные изменения белков, связанные, например, с агрегатобразованием, выражено усиливают реализацию их ИФН-индуцирующих свойств.

Целью исследования явилась оценка способности человеческого сывороточного γ -глобулина, конформационно измененного за счет присоединения катионов меди или цинка, индуцировать выработку ИФН лейкоцитами периферической крови человека.

Методика исследования. Индукцию ИФН в суспензиях лейкоцитов 10 здоровых доноров (10^6 клеток в 1 мл) проводили в полной питательной среде, приготовленной на основе среды двойной Игла, в течение 24 или 48 ч при 37°C. Использовали образцы модифицированного катионами меди или цинка γ -глобулина (ICN) в конечных концентрациях 5,0; 0,5 и 0,05 мкг/мл. Параллельно оценивали действие контрольных препаратов γ -глобулина и солевых растворов меди и цинка, содержание катионов в которых соответствовало количеству металла, связанного с белком. Контрольными индукторами выработки ИФН служили: вирус болезни Ньюкасла (10 ЦПД на лейкоцит) и фитогемагглютинин Р (ФГА, Difco, 1,0 мкг/мл). Титрование ИФН проводили на монослойной культуре диплоидных фибробластов эмбриона человека против 1 ЦПД50 вируса энцефаломиокардита мышей.

Результаты работы показывают, что контрольные образцы γ -глобулина, а также катионы меди и цинка в солевых растворах индуцируют выработку раннего (24 ч) ИФН, по уровню сопоставимую с ФГА. Отсутствие вы-

раженной дозовой зависимости эффекта свидетельствует о более низком, чем примененные концентрации, пороге чувствительности лейкоцитов человека к действию использованных препаратов. Продукция позднего (48 ч) ИФН подчиняется тем же закономерностям, за исключением нарастания титров ИФН, индуцируемого ФГА. Комплекс γ -глобулина с цинком обладает в 1,5-1,6 раза сниженной активностью по сравнению с цинком и в 1,2-1,3 раза – в сопоставлении с контрольным белком. Комплекс γ -глобулина с медью, напротив, реализует более высокий ИФН-индуцирующий потенциал: титры вырабатываемого в его присутствии ИФН превышают показатели меди в 1,3 раза и контрольного белка – в 1,5 раза. Модифицированный медью γ -глобулин оказывается в 1,5 раза более активным, чем белок, присоединивший катионы цинка. Собственным противовирусным действием использованные биорегуляторы не обладают.

Заключение. Вызываемые встраиванием в структуру молекулы γ -глобулина катионов металлов конформационные преобразования белка приводят к изменению его эффекторных свойств, реализующихся индукцией выработки ИФН. При этом цинк ослабляет, а медь усиливает проявление ИФН-индуцирующей активности γ -глобулина. Одновременно цинк утрачивает потенциал индуктора ИФН, в то время как медь, не исключено, реализует его и в составе белкового металлокомплекса.

ВЛИЯНИЕ МИКРОБНЫХ КОМПОНЕНТОВ НА ЭКСПРЕССИЮ АДГЕЗИОННЫХ МОЛЕКУЛ ICAM-1 НА МОНОЦИТОПОДОБНЫХ И ЭНДОТЕЛИАЛЬНЫХ КЛЕТКАХ ЧЕЛОВЕКА

Чернова А.А., Старикова Э.А., Фрейдлин И.С.

НИИ экспериментальной медицины РАМН, Санкт-Петербург, Россия

Наименее изученным до настоящего времени остается вопрос о возможности непосредственного влияния продуктов микробного происхождения на свойства эндотелиальных клеток. Описана, в основном, способность микробных компонентов индуцировать продукцию мононуклеарными фагоцитами провоспалительных цитокинов, которые опосредуют активирующее действие на эндотелиальные клетки. Именно такой механизм повышения экспрессии адгезионных молекул на поверхности эндотелия при воспалении считается общепризнанным.

Цель данного исследования состояла в оценке влияния отдельных компонентов бактериального происхождения (LPS, PPD) на уровень экспрессии адгезионных молекул ICAM-1 (CD54) на клетках моноцитоподобной линии ТНР-1 в сопоставлении с влиянием тех же веществ на экспрессию молекул CD54 на эндотелиальных клетках линии EA.hy926.

Молекулы CD54 конститутивно экспрессировались и на клетках ТНР-1, и на клетках EA.hy926. Клетки линий ТНР-1 и EA.hy926 инкубировали 24 ч в присутствии различных концентраций микробных компонентов и TNF α (в качестве положительного контроля).

Бактериальный липополисахарид (LPS) достоверно повышал уровень экспрессии молекул CD54 на эндотелиальных клетках EA.Hy 926, уступая по интенсивности стимулирующему действию стандартному активатору эндотели-

альных клеток – TNF α . В отличие от этого другой продукт микробного происхождения – туберкулин (PPD) – не оказывал никакого влияния на уровень экспрессии молекул CD54 на эндотелиальных клетках EA.Hy 926.

Бактериальный липополисахарид (LPS) достоверно повышал уровень экспрессии молекул.

CD54 и на моноцитоподобных клетках ТНР-1, незначительно уступая по интенсивности стимулирующему действию цитокина TNF α . В случае действия на моноцитоподобные клетки линии ТНР-1 другого продукта микробного происхождения – туберкулина (PPD) – он также достоверно повышал экспрессию адгезионных молекул CD54, несколько превосходя LPS и не уступая цитокину TNF α по интенсивности стимулирующего действия.

Сравнение результатов подтверждает способность продуктов микробного происхождения LPS и PPD повышать уровень экспрессии адгезионных молекул CD54 на поверхности моноцитоподобных клеток линии ТНР-1 при инкубации клеток с этими продуктами. Обнаружены различия чувствительности эндотелиальных клеток линии EA.hy 926 к действию двух изученных продуктов микробного происхождения: PPD, в отличие от LPS, не оказывал влияния на уровень экспрессии адгезионных молекул CD54 на этих клетках. Впервые показано, что по уровню стимулирующего действия на моноцитоподобные клетки ТНР-1 PPD не уступает цитокинам TNF α .

По поводу возможного прямого влияния микробных продуктов на экспрессию адгезионных молекул на эндотелиальных клетках, на процесс трансэндотелиальной миграции в литературе встречаются лишь предположения о возможности такого действия через Toll-подобные рецепторы (TLR). В частности, на поверхности эндотелиальных клеток HUVEC были выявлены TLR4, но не TLR2. С этим согласуются полученные нами результаты об отсутствии стимулирующего действия PPD, который связывается только с TLR2, на экспрессию адгезионных молекул CD54 на эндотелиальных клетках линии EA.Hy. 926. Вместе с тем, другой продукт микробного происхождения LPS, который легко связывается с TLR4, вызывал существенный прирост экспрессии молекул CD54 на эндотелиальных клетках. Влияние микробных компонентов на поверхностный фенотип моноцитов и эндотелиальных клеток при их взаимодействии нуждается в дальнейшем изучении.

Исследование поддержано грантом РФФИ № 06-04-48110.

СИСТЕМА ФАГОЦИТИРУЮЩИХ МОНОНУКЛЕАРОВ И ФИЗИОЛОГИЧЕСКАЯ РЕГЕНЕРАЦИЯ ПЕЧЕНИ У КРЫС ПОСЛЕ СПЛЕНЭКТОМИИ

Чиши М.А., Данилова И.Г., Юшков Б.Г., Гетте И.Ф., Шарапова Н.Е.

Институт иммунологии и физиологии УрО РАН, г. Екатеринбург, Россия

Введение. Исследования последних лет показали, что иммунная система способна регулировать физиологическую и репаративную регенерацию различных тканей. В то же время практически неисследованным является участие системы фагоцитирующих мононуклеаров (СФМ)

в целом на течение восстановительного роста тканей и каким образом изменение количества клеток СФМ и их исходного состояния отражается на физиологической регенерации тканей.

Целью настоящей работы явилось: изучить роль СФМ в регуляции физиологической регенерации печени.

Задачи:

1) Оценить связь между количеством клеток СФМ и физиологической регенерацией печени.

2) В модели спленэктомии исследовать влияние функционального состояния СФМ на физиологическую регенерацию печени.

Материалы и методы. Опыты проводились на беспородных крысах самцах массой 180-230 г, находящихся на обычном рационе вивария. Поскольку значительное количество макрофагов организма находится в селезенке, то изменение клеток СФМ достигалось спленэктомией. Регулирование активности клеток СФМ производили за счет однократного введения экспериментальным животным активатора макрофагов – отечественного препарата «Тамерит» (внутримышечно в дозе 2 мг/кг) и ингибитора – каррагенана (внутрибрюшинно в дозе 10 мг/кг). Состояние регенераторных процессов в печени изучали через 4 и 17 ч после операции, что соответствовало деструктивно-реактивной и пролиферативной фазе восстановительного роста железы. Для оценки регенераторных процессов использовали следующие показатели: коэффициент массы печени; процентное содержание сухого вещества в ткани; митотический индекс, количество двуядерных клеток, ядерно-цитоплазматический индекс.

Результаты исследования. Полученные на примере спленэктомии данные свидетельствуют, что СФМ занимает одно из центральных мест в физиологической регенерации печени. Удаление селезенки не вызывает изменение объема регенерирующей печени, однако в оба исследованных срока развивается выраженный отек органа за счет снижения в нем сухой массы. Отмечается возрастание размеров гепатоцитов и их ядер, величины ядерно-цитоплазматического индекса и количества двуядерных клеток. Все это свидетельствует об активации процессов внутриклеточной регенерации, протекающих в печени, поскольку митотический индекс гепатоцитов не изменяется.

Активирование макрофагов у спленэктомизированных животных усиливает внутриклеточную регенерацию гепатоцитов, так как размеры ядер гепатоцитов значительно увеличиваются через 17 ч после операции, что, вероятно, связано с их полиплоидизацией. Число двуядерных клеток растет в оба исследованных срока по сравнению с животными, не получавшими препарат.

Ингибция макрофагов вызывает снижение ядерно-цитоплазматического индекса гепатоцитов после 17 ч после воздействия, количество двуядерных клеток по сравнению с контрольными животными уменьшается, а число клеток, делящихся митозом, равно нулю. Торможение активности макрофагов снижает регенераторные процессы в печени.

Выводы. Таким образом на основании проведенных исследований можно утверждать, что исходное состояние СФМ (качественный и количественный состав) оказывает выраженное воздействие на процессы физиологической регенерации печени.

ИЗМЕНЕНИЕ ПРОЛИФЕРАТИВНОГО ОТВЕТА ЛИМФОЦИТОВ И ВЛИЯНИЕ НА НЕГО АГОНИСТА БЕТА-АДРЕНОРЕЦЕПТОРОВ В КУЛЬТУРАХ С ФИТОГЕМАГГЛУТИНИНОМ У ПОСТРАДАВШИХ С ПРОНИКАЮЩИМ РАНЕНИЕМ ГЛАЗА

Чуприна В.В., Денисов В.Е., Шилов Ю.И., Гаврилова Т.В., Черешнева М.В.

Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН, г. Пермь

Институт иммунологии и физиологии УрО РАН, г. Екатеринбург, Россия

Патогенез проникающего ранения глаза (ПРГ), являющегося одной из главных причин снижения и потери зрения, сложен и имеет многофакторную природу. При этой патологии наблюдается развитие не только локальных реакций, но и выявляются признаки вторичной иммунной недостаточности, которая во многом связана со стрессорными сдвигами, развивающимися в ответ на угрозу утраты информационно важного органа. Исследованиями последних лет подтверждена важная роль иммунной системы в патогенезе воспалительного процесса поврежденного глаза. В связи с этим проблема иммунокоррекции при ранении глаза как одной из форм травмы представляется чрезвычайно актуальной. Ранее в исследованиях нашего коллектива и в работах других авторов показана эффективность применения отечественного препарата миелопида в комплексной терапии ПРГ. Однако ряд аспектов его иммуномодулирующего действия при данном виде травмы остается недостаточно исследованным.

Цель настоящей работы: исследование изменения пролиферативного ответа лимфоцитов и влияния на него агониста бета-адренорецепторов в культурах с фитогемагглютинином у пострадавших с ПРГ на фоне комплексного лечения, включающего миелопид.

Материалы и методы. Клиническое и иммунологическое обследование проведено у 12 мужчин в возрасте от 20 до 50 лет с ПРГ тяжелой степени. Роговичное ранение имело место на 5 глазах, роговично-склеральное – на 7. Все ранения были осложненные: сопровождалось повреждением хрусталика на 4-х глазах, гифемой и гемофтальмом – на 5, выпадением тканей – на 7; металлическое инородное тело в полости глаза было на 4 глазах. Во всех случаях отмечались признаки раневой инфекции. При поступлении в стационар производилась первичная хирургическая обработка ран (ПХО) в необходимом объеме, назначалась традиционная стандартная терапия (антибиотики, глюкокортикоиды, нестероидные противовоспалительные препараты и др.). Иммунологическое обследование проводили дважды: при поступлении в стационар на 1-3-и сутки и на 12-14-е сутки после ранения глаза. Пострадавшие были разделены на две группы: 1-я (6 человек) – получали только стандартную терапию; 2-я (6 человек) – стандартную терапию в сочетании с миелопидом, назначение которого показано при наличии клинических признаков вторичной иммунной недостаточности. Препарат вводили лимфотропно и внутримышечно на 1-2-е сут после ПХО в дозе 3 мг/сутки ежедневно в течение 5 дней. Пролиферативный ответ лимфоцитов периферической крови в системе *in vitro* оценивали по включению 3Н-тимидина в 72-часовых

культурах с фитогемагглютинином-П (ФГА, Sigma, США в концентрациях 2,5; 5; 10; 20 и 40 мкг/мл). Для оценки участия изменения функциональной экспрессии β -адренорецепторов в модуляции пролиферативного ответа лимфоцитов в культуры вносили агонист β -адренорецепторов гексопреналина сульфат в концентрации 10^{-6} М. Контрольная группа включала 10 практически здоровых мужчин-добровольцев в возрасте от 25 до 56 лет.

Основные результаты. Установлено, что в раннем травматическом периоде пролиферативная активность лимфоцитов в сравнении с контрольной группой достоверно снижается. Внесение в культуру гексопреналина сульфата приводит к еще более выраженному снижению пролиферации при концентрациях ФГА 40 и 20 мкг/мл. При повторном обследовании пациентов 1-й группы отмечено статистически значимое повышение пролиферации в культурах с концентрацией ФГА 2,5 и 5 мкг/мл в сравнении с ранним травматическим периодом, при этом показатели бласттрансформации лимфоцитов достоверно не отличаются от контрольной группы. Угнетающий эффект гексопреналина сульфата сохраняется только в культурах с 40 мкг/мл ФГА. У пациентов 2-й группы сохраняется супрессия пролиферативного ответа лимфоцитов, а гексопреналина сульфат не влияет на бласттрансформацию лимфоцитов.

Заключение. При проникающем ранении глаза наблюдаются фазные изменения пролиферативного ответа лимфоцитов на ФГА, которые связаны со сроком травматического периода. Супрессивное действие бета-адренергического агониста гексопреналина сульфата в наибольшей степени выражено в ранний травматический период. Включение миелопида в комплексное лечение не отменяет супрессии пролиферации лимфоцитов. Отсутствие стимулирующего действия миелопида на ответ к Т-клеточному митогену с учетом ведущей роли реакций Th1-типа в иммунопатологии глаза, на наш взгляд, является положительным.

Работа поддержана грантами РФФИ 06-04-48897 и 06-04-49001, Программы Президиума РАН «Молекулярная и клеточная биология» и Интеграционного проекта УрО РАН совместно с СО РАН.

РАСПОЗНАВАНИЕ АЛЛЕРГЕНОВ, ПОПАДАЮЩИХ В ОРГАНИЗМ РЕСПИРАТОРНЫМ ПУТЕМ: МОДЕЛЬ АЛЛЕРГИИ НА МЫШАХ

Шевченко М., Алексеева Л., Фомичева Н., Шеховцова Е., Свирщевская Е.

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

Введение. Одним из перспективных методов доставки различных вакцин является сублингвальная или мукозальная иммунизация. Однако эпителиальный барьер бронхо-легочной системы и слизистой оболочки полости рта удерживает значительное количество вводимого антигена. Ранее для иммунизации использовали растворимые белковые антигены, вводимые с адьювантами или в растворимом виде подкожным путем. В ряде моделей аллергии на мышах используют также и интраназальную (и/н) иммунизацию растворимыми белками. В этом случае эпителиальный барьер играет значительную роль,

снижая эффективную концентрацию белков в десятки раз. Поскольку в норме через эпителиальный барьер попадает в малых дозах огромное количество веществ, в том числе и совершенно безвредных, иммунная система эволюционировала в сторону индукции толерантности к белкам, попадающим через эпителиальный барьер. При забарьерном (в/б или п/к) введении антигена экзогенный белок попадает в организм без потери активности на эпителиальном барьере. Оценка эффективности удержания антигена при и/н иммунизации ранее не проводилась.

Цель. Целью данной работы было сравнение порогов распознавания основного белка грибов *Aspergillus fumigatus* Asp f 2, вводимого в/б или и/н путем, в мышинной модели аллергии.

Методы. В исследовании использовали мышей линий BALB/c, C57BL/6 и СВА. Белки вводили в разных дозах в фосфатном буфере (ФБ) двумя курсами по 5 дней с интервалом в 2 дня. Для в/б инъекций использовали дозы антигена: 1 нг, 10 нг, 100 нг, 1 мкг, 10 мкг, 100 мкг/мышь/инъекцию. В случае и/н иммунизации разовые дозы составляли: 1 мкг, 10 мкг, 100 мкг/мышь. Уровень антител IgG1 в сыворотках крови определяли с использованием ИФА.

Результаты. Многократное введение белка Asp f 2 в ФБ без использования адьювантов, как в случае и/н, так и в случае в/б введения, приводило к формированию гуморального ответа на вторую неделю после первой инъекции. При этом в случае в/б иммунизации минимальная доза белка, распознаваемая иммунной системой, составляла 100 нг/мышь/инъекцию. Различий между линиями мышей не наблюдалось. При и/н иммунизации продукция IgG1 наблюдалась лишь в группе мышей, получавших 100 мг/мышь/инъекцию. У животных, иммунизированных 10 и менее мг/мышь/инъекцию Asp f 2 и/н, уровень IgG1 в сыворотке крови не отличался от контроля. В отличие от в/б инъекций, при и/н иммунизации наблюдалось межлинейное различие в продукции антител. Мыши линии BALB/c реагировали сниженной продукцией IgG1 по сравнению с мышами линий C57BL/6 и СВА.

Выводы. Сопоставление распознаваемых доз показало, что более 99% белка удерживается на поверхности слизистой оболочки мышей, иммунизированных и/н, за счет функционирования системы мукоцилиарного клиренса, белков-сурфактантов и резидентных макрофагов. Для белка Asp f 2 различие в пороге распознавания при в/б и и/н доставке антигена достигало 3-х порядков. Полученные данные актуальны при проектировании мукозальных вакцин и расчета оптимальной концентрации препаратов.

РАЗЛИЧИЯ В ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ СУБПОПУЛЯЦИЙ ЭФФЕКТОРОВ CD4⁺CD27^{hi} И CD4⁺CD27^{lo} ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ТУБЕРКУЛЕЗНОЙ ИНФЕКЦИИ

Шепелькова Г.С., Капина М.А., Лядова И.В.

Государственное Учреждение Центральный Научно-исследовательский Институт Туберкулеза РАН, Москва, Россия

Исследования последних лет показали, что основным путем защиты хозяина от микобактериальной инфекции

является элиминация микобактерий активированными макрофагами с образованием структур типа гранулем. Этот процесс во многом зависит от миграции в очаг воспаления иммунокомпетентных клеток, макрофагов и CD4⁺T-лимфоцитов и секреции последними растворимых цитокинов (IFN γ и TNF α), которые активируют инфицированные макрофаги. Генерация эффекторных CD4⁺T-лимфоцитов, секретирующих IFN γ , а также их миграция в очаг инфекции, в легкие, являются ключевыми моментами, обуславливающими протекцию при туберкулезной инфекции. Недавно было показано, что лимфоциты-эффекторы, экспрессирующие фенотип CD44^{hi}CD62L^{lo}, можно подразделить на две субпопуляции, отличающиеся по уровню экспрессии CD27 (рецептор семейства TNF), причем высокой способностью к продукции IFN γ обладает лишь субпопуляция лимфоцитов CD62L^{lo}CD27^{lo}. Не выяснено, однако, отличаются ли эти субпопуляции по другим характеристикам.

Целью настоящей работы явилось сравнение экспрессии поверхностных маркеров и функциональной активности субпопуляций CD62L^{lo}CD27^{hi} и CD62L^{lo}CD27^{lo} эффекторных лимфоцитов CD4 при экспериментальной туберкулезной инфекции.

Исследования проводили на мышцах линии C57BL/6, инфицированных вирулентными *M. tuberculosis* штамма H37Rv. С помощью проточной цитофлюорометрии определяли поверхностный фенотип и продукцию ряда цитокинов (IL-2, TNF α , IFN γ) лимфоцитами CD62L^{lo}CD27^{hi} и CD62L^{lo}CD27^{lo} в лимфатических узлах, селезенке и легких. Исследования показали, что инфекция приводила к увеличению уровня экспрессии костимуляционного маркера iCOS, относящегося к семейству рецепторов B7-CD28. Во всех исследуемых органах эффекторные лимфоциты CD62L^{lo}CD27^{hi} и CD62L^{lo}CD27^{lo} не отличались по уровню экспрессии iCOS. Экспрессия другого рецептора семейства B7-CD28, CTLA-4, зависела от локализации лимфоцитов. В лимфоидных органах CTLA-4 был экспрессирован на обеих субпопуляциях эффекторных CD4⁺T-лимфоцитов, а в легких этот рецептор обнаруживался только на клетках CD62L^{lo}CD27^{hi}. Поскольку рецептор CTLA-4 ингибирует сигнал к активации и пролиферации эффекторных лимфоцитов, можно предположить, что отсутствие этого рецептора на эффекторных лимфоцитах CD62L^{lo}CD27^{lo} в легких является одним из механизмов, обеспечивающих поддержание их функциональной активности.

Также была исследована экспрессия маркера CD45RB, снижение которой принято считать показателем активации лимфоцитов. Действительно, по мере дифференцировки «наивных» лимфоцитов в эффекторы CD62L^{lo}CD27^{hi} и далее — в эффекторы CD62L^{lo}CD27^{lo} экспрессия CD45RB снижалась. Обе субпопуляции лимфоцитов-эффекторов в лимфоидных органах практически не отличались по уровню экспрессии CD45RB. В легких процент эффекторов экспрессирующих фенотип CD27^{lo} CD45RB^{lo} увеличивался, что свидетельствует о том, что в легких лимфоциты-эффекторы CD62L^{lo}CD27^{lo} активированы сильнее, чем в лимфоидной ткани.

Было обнаружено, что в состав субпопуляции лимфоцитов CD62L^{lo}CD27^{hi} входят клетки, экспрессирующие CD25 и транскрипционный фактор Foxp3 (экспрессия этих маркеров характерна для популяции регуляторных T-клеток). Исследования показали, что накопление ре-

гуляторных T-клеток CD25⁺Foxp3⁺ происходит преимущественно в лимфоидных органах, а не в легких.

Определение содержания внутриклеточных цитокинов в каждой из субпопуляций эффекторных CD4⁺T-лимфоцитов показало, что высокий уровень продукции провоспалительных цитокинов TNF α , IFN γ и IL-2 характерен для эффекторов CD62L^{lo}CD27^{lo}. Максимальная секреция этих цитокинов наблюдалась в легких.

Таким образом, субпопуляции эффекторных CD4⁺T-лимфоцитов CD62L^{lo}CD27^{hi} и CD62L^{lo}CD27^{lo} отличаются от «наивных» лимфоцитов более высоким уровнем экспрессии рецепторов семейства B7-CD28 (iCOS и CTLA-4) и снижением экспрессии CD45RB, что говорит об их активации. Субпопуляция лимфоцитов-эффекторов CD62L^{lo}CD27^{lo} отличается от субпопуляции CD62L^{lo}CD27^{hi} большей степенью активации и продукцией эффекторных цитокинов. В очаге инфекции (в легких) эффекторные T-лимфоциты CD62L^{lo}CD27^{lo} активированы сильнее, чем в лимфоидной ткани (лимфатические узлы и селезенка).

МОДУЛЯЦИЯ ФАГОЦИТАРНОЙ И ОКИСЛИТЕЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ НЕЙТРОФИЛОВ ЧЕЛОВЕКА ГОРМОНАМИ РЕПРОДУКЦИИ

Ширшев С.В., Некрасова И.В.

Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН, г. Пермь, Россия

В последнее время все больше внимания уделяется изучению неспецифического иммунитета при беременности. Наиболее многочисленной популяцией среди клеток крови являются нейтрофилы, которые помимо формирования ранних защитных реакций являются активными участниками родовой деятельности. На данном типе клеток обнаружены рецепторы для гормонов, принимающих участие в обеспечении процесса гестации, что предполагает их участие в регуляции функциональной активности нейтрофилов.

Цель работы: изучение модулирующего влияния основных гормонов репродукции и их физиологических сочетаний на фагоцитарную и окислительную активность нейтрофилов человека.

Материалы и методы исследования. Объектом изучения являлись сепарированные нейтрофилы периферической венозной крови здоровых небеременных женщин репродуктивного возраста. Для выделения чистой популяции нейтрофилов применяли двойной градиент плотности фиколл-верографина. Исследование проводилось *in vitro*. Гормоны использовали в концентрациях, отражающих их уровни в крови соответственно в I и III триместры беременности: хорионический гонадотропин (ХГ) — 100 и 10 МЕ/мл, эстриол (E₃) — 2 и 20 нг/мл, эстрадиол (E₂) — 1 и 10 нг/мл, прогестерон (Pr) — 20 и 100 нг/мл, лептин — 10 и 35 нг/мл. Гормоны вносили в пробы по отдельности и в физиологических сочетаниях, характерных для указанных триместров беременности, а именно: I триместр — ХГ 100 МЕ/мл + E₂ 1 нг/мл + E₃ 2 нг/мл + Pr 20 нг/мл + лептин 10 нг/мл, III триместр — ХГ 10 МЕ/мл + E₂ 10 нг/мл + E₃ 20 нг/мл + Pr 100 нг/мл + лептин 35 нг/мл. В качестве контроля использовали официальные растворители гормонов. После часовой инкубации с гормонами определяли

фагоцитарную активность нейтрофилов по степени снижения свечения люминесцентного генно-инженерного штамма бактерий *E. coli lux⁺* при их поглощении клетками через 30 минут инкубации, а также их окислительную активность в тесте люминол-зависимой хемилюминесценции (ЛЗХЛ). Активаторами нейтрофилов в стимулированном варианте ЛЗХЛ, который оценивали на 20-й минуте, служили опсонизированные бактерии *E. coli* К-12. Статистическая обработка результатов проводилась с использованием t-критерия Стьюдента ($p < 0,05$).

Результаты исследования. При оценке фагоцитарной активности нейтрофилов установлено ее снижение в присутствии ХГ, низкой дозы лептина и высокой – Е2; Е3 и Рг на данный процесс не влияли. При этом сочетание всех исследуемых гормонов, соответствующее I триместру, также обладало угнетающим действием, основой которого, по-видимому, явились самостоятельные эффекты низких доз лептина и ХГ. Однако несмотря на то что по отдельности ХГ и Е2 достоверно понижали фагоцитоз нейтрофилов, в комбинации всех 5-ти гормонов в дозах, характерных для III триместра, данный эффект не наблюдался.

При оценке окислительной активности показано, что под воздействием всех исследуемых гормонов и их сочетаний (за исключением лептина и ХГ в высоких концентрациях) уровень спонтанной ЛЗХЛ нейтрофилов достоверно повышался. В то же время на показания стимулированного варианта люминесценции гормоны статистически значимого действия не оказали.

Заключение. Таким образом, полученные данные свидетельствуют о том, что исследованные гормоны способны разнонаправленно регулировать фагоцитарную и окислительную активность нейтрофилов человека, а в комбинациях доз, свойственных разным триместрам беременности, могут нивелировать действие друг друга.

АЛКИЛОКСИБЕНЗОЛЫ В СИСТЕМЕ ИММУНОЛОГИЧЕСКИХ РЕАКЦИЙ *IN VITRO*

Шушпанова О.Н.¹, Казацкая Ж.А.¹, Новиков В.В.¹, Эль-Регистан Г.И.²

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

² Институт микробиологии РАН, Москва, Россия

В настоящее время большое внимание уделяется алкилоксибензолам (АОБ) – химически синтезиро-

ванным аналогам ауторегуляторного фактора анабиоза микроорганизмов (фактора d1). Известно, что АОБ способствуют изменению функциональной активности и приобретению устойчивости к экстремальным условиям не только бактериальных клеток, но и эукариотических, обладают шапероноподобным действием, являются структурными модификаторами белка. Имеются сведения о влиянии АОБ на рост культуры клеток фибробластов мышей, а также на некоторые факторы гуморального иммунитета, в частности, на активность антител против HBs-антигена. Чрезвычайно важно выяснение того, насколько универсальным является действие АОБ по отношению к иммунокомпетентным клеткам организмов, роли АОБ в работе некоторых звеньев иммунного ответа.

Цель работы: изучение влияния АОБ на функциональную активность клеток крови и некоторые факторы неспецифической резистентности в условиях *in vitro*.

Задачи исследования: определение влияния АОБ розеткообразующую активность Т-лимфоцитов, адгезивные свойства мононуклеаров, фагоцитарную активность нейтрофилов, активность системы комплемента.

В экспериментах использованы химические аналоги ауторегуляторного фактора анабиоза микроорганизмов: АОБ С7, АОБ С8, АОБ С12. В работе применен комплекс лабораторных методов, включающий тест на жизнеспособность клеток крови, спонтанное розеткообразование Т-лимфоцитов, адгезию к синтетическим материалам, активацию системы комплемента в геле агарозы, люминол-зависимую хемилюминесценцию.

В результате проведенных исследований определены концентрации АОБ, оказывающие стабилизирующее и цитотоксическое действие на мононуклеарные клетки крови человека и эритроциты. Установлено разнонаправленное действие АОБ на розеткообразующую активность отдельных популяций Т-лимфоцитов. Отмечено повышение адгезивности мононуклеарных клеток при действии АОБ С7 и снижение адгезивных свойств в присутствии АОБ С8 и АОБ С12. Выявлен параллелизм между изменением розеткообразующей активности лимфоцитов и их адгезивных свойств. Установлено изменение активности системы комплемента под воздействием АОБ С7. Выявлено дозозависимое стимулирующее действие АОБ на фагоцитарную активность нейтрофилов.

Таким образом, в результате работы получены новые данные о роли АОБ на некоторые звенья иммунитета в условиях *in vitro*.