

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

ГРИБЫ РОДА *CANDIDA* СТИМУЛИРУЮТ ОБРАЗОВАНИЕ НЕЙТРОФИЛЬНЫХ ВНЕКЛЕТОЧНЫХ ЛОВУШЕК

Андреева Ю.С., Долгушин И.И., Савочкина А.Ю.,
Рыжкова А.И.

НИИ иммунологии ГОУ ВПО «Челябинская
государственная медицинская академия», г. Челябинск,
Россия

По данным ВОЗ, пятая часть населения Земли страдает различными грибковыми заболеваниями. Кандидоз — самый распространенный из системных микозов человека и заболеваний, связанных с кандидозным поражением слизистых оболочек, так как свыше 40% взрослых людей являются носителями *Candida albicans* (*C. albicans*), и любое серьезное нарушение местного или общего иммунитета может спровоцировать их активацию.

Слизистая влагалища является экологической нишей, в которой постоянно вегетирует большое количество различных видов бактерий, вирусов, грибов как у практически здоровых женщин, так и у больных. В структуре инфекционной патологии нижнего отдела гениталий кандиды составляют 40-50%. *C. albicans* считается основным возбудителем урогенитального кандидоза. На ее долю, по разным данным, приходится от 60 до 90% поражений.

В последние годы большой интерес исследователей вызывает изучение взаимоотношений между кандидами и факторами неспецифической защиты слизистых оболочек.

Несмотря на многочисленные исследования роли местного иммунитета в антикандидозной защите, недостаточно изучены механизмы взаимодействия кандид и нейтрофильных гранулоцитов, являющихся основными клетками секретов слизистых оболочек. В последние годы показано, что при действии бактерий нейтрофилы секретируют в окружающую среду свою ДНК, формируя нейтрофильные внеклеточные ловушки, которые участвуют в противoinфекционной защите слизистых оболочек.

Цель и задачи: определить влияние грибов рода *Candida* на формирование нейтрофильных внеклеточных ловушек.

Материалы и методы. Изучили влияние грибов рода *Candida* штамм 601 на образование внеклеточных ловушек нейтрофилами периферической крови женщин репродуктивного возраста и оценили эффективность улавливания дрожжеподобных грибов внеклеточными нейтрофильными сетями.

Основные результаты. В процессе активации *in vitro* грибами рода *Candida* нейтрофилы формируют внеклеточные нейтрофильные ловушки, при этом эффектив-

ность нейтрофильных внеклеточных сетей составляет 61,5%, а индекс ловушки — 5,11 микробных клеток, что значительно превышает показатели фагоцитоза.

Заключение. Грибы рода *Candida* стимулируют формирование нейтрофильных ловушек, при этом антимикробная эффективность нейтрофильных внеклеточных сетей значительно превосходит фагоцитарную активность гранулоцитов по отношению к дрожжеподобным грибам.

ИЗМЕНЕНИЕ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ ЦИТОКИНОВ В ОРГАНИЗМЕ ЖИВОТНЫХ ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ИНФЕКЦИИ, ВЫЗВАННОЙ *LISTERIA MONOCYTOGENES*

Антошина И.Ф., Шаповал И.М., Юров Д.С.,
Барфоломеев А.Ф., Ермолаева С.А., Мезенцева М.В.

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

Патогенная бактерия *Listeria monocytogenes* размножается внутри цитоплазмы эукариотических клеток разных типов, включая гепатоциты, спленоциты, макрофаги и эпителиальные клетки. В ходе инфекции *L. monocytogenes* способна перемещаться из клетки в клетку, не покидая внутриклеточное пространство, что делает ее малодоступной для гуморальных факторов иммунной защиты. Считается, что протективный эффект при листериозной инфекции опосредуется цитолитическими Т-клеткам. Для понимания механизмов изменений в иммунной системе при листериозе в данной работе проведены эксперименты *in vivo* по исследованию изменений транскрипции генов регуляторных цитокинов в организме мышей Balb/c при экспериментальной инфекции, вызванной *L. monocytogenes*. Использовали штамм *L. monocytogenes* дикого типа EGDe. В эксперименте № 1 мышам внутривенно вводили суспензию бактерий, содержащую 10³ КОЕ/мышь, что составляет 1/20 от LD50. В эксперименте № 2 доза заражения составляла 10⁴ КОЕ/мышь, т.е. около 1/2 LD50. Экспрессия генов 11 цитокинов (IFN α , IFN γ , IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12, IL-18, TNF α) оценивалась в спленоцитах, выделенных из селезенок мышей, по активности их мРНК, определяемой методами обратной транскрипции и полимеразной цепной реакции (ОТ-ПЦР). Спленоциты выделяли через 6 часов, 24 часа, 48 часов и 72 часа (эксперимент №1), а также через 6 часов, 3 суток, 7 суток после заражения животных *L. monocytogenes* (эксперимент № 2). В те же сроки производили высевы на чашки Петри для подсчета накопления бактерий в печени мышей.

В эксперименте № 1 было отмечено подавление экспрессии генов цитокинов, участвующих в синтезе IFN γ ; IFN α , IL-12 и IL-18. На протяжении 3 суток наблюдения было выявлено подавление экспрессии гена

только одного противовоспалительного цитокина – IL-4, но не IL-10. В течение всех 3 дней у животных, зараженных *L. monocytogenes*, была отмечена активация синтеза мРНК IL-6.

В эксперименте № 2 нами были обнаружены определенные закономерности изменения экспрессии генов цитокинов. В первые 6 часов и на протяжении всего срока наблюдения после заражения у мышей обнаруживалось подавление экспрессии генов цитокинов, вырабатываемых Th-1, IFN γ и IL-2, а также – IL-12. Так же было выявлено снижение продукции мРНК IL-10, вырабатываемого Th-2. В разные сроки в течение всего исследования (7 дней) у животных было отмечено подавление экспрессии генов цитокинов, вырабатываемых В-лимфоцитами и моноцитами/макрофагами: IL-1 β , IL-12 и TNF α – уже через 6 часов развития инфекции, IL-18 – начиная с 1 суток, IFN α – начиная с 2-3 дня после заражения. На протяжении всего срока наблюдения в некоторых случаях у мышей был обнаружен активный синтез мРНК IL-4 (противовоспалительный цитокин) и IL-6 (провоспалительный цитокин), вырабатываемых Th-2.

Таким образом, у мышей, зараженных *L. monocytogenes*, нами было обнаружено снижение экспрессии генов цитокинов, вырабатываемых Th-1, В-лимфоцитами и моноцитами / макрофагами, а также дисбаланс в синтезе цитокинов, продуцируемых Th-2. Изменения в экспрессии генов цитокинов имели более выраженный характер при более высокой дозе заражения. На основании полученных данных можно предположить, что при листериозе происходит нарушение функций практически всех иммунокомпетентных клеток организма. Исследования продолжаются.

РАЗЛИЧИЯ В ТЕЧЕНИИ СПЕЦИФИЧЕСКОГО ВОСПАЛЕНИЯ ЛЕГОЧНОЙ ТКАНИ, ВЫЗВАННОГО *M. AVIUM*, У МЫШЕЙ ОППОЗИТНЫХ ЛИНИЙ I/ST И C57BL/6

Авербах М.М., Кондратьева Е.В.

ГУ Центральный НИИ туберкулеза РАМН, Москва, Россия

В проведенных ранее исследованиях было показано, что мыши I/St чрезвычайно чувствительны к таким внутриклеточным инфекциям, как *M. tuberculosis* и таксономически неродственным – *Chlamydia pneumoniae* и *Salmonella enterica*.

M. Avium – наиболее распространенный вид нетуберкулезных микобактерий, также может обуславливать легочную патологию, особенно в ассоциации с ВИЧ- и СПИД-инфекцией. В связи с этим мы изучали характер инфекционного процесса, вызванного вирулентным штаммом *M. Avium* 724R у инбредных линий мышей I/St и B6, чувствительных и резистентных к *M. tuberculosis*. В результате исследования выявлены оппозитные по чувствительности к заражению *M. Avium* линии инбредных мышей I/St (резистентная) и B6 (чувствительная). Аэрогенное заражение мышей дозой 2×10^3 КОЕ привело к гибели чувствительной линии B6 на 5-6-й месяц после заражения. Высеваемость *M. Avium* из ткани легких мышей B6, начиная с 8 недели после заражения, была достоверно по сравнению с мышами I/St. Морфологически значимые различия в характере течения специфического воспаления выявляются начиная с 8-й недели после заражения и на 16-ю неделю у мышей линии B6

выявлены очаги распада легочной ткани. Аналогичные межлинейные различия отмечены между линиями мышей при изучении количества и фенотипа клеток, инфильтрирующих ткань легкого. Уровень клеток в легком, лимфоцитов, CD4, CD8, CD19, Mac3 и Lyb6G положительных клеток у мышей B6 был значительно выше, чем у мышей I/St. На 16-й неделе количество лимфоцитов, CD4, CD8, CD19 положительных клеток у мышей B6 снижалось и практически не отличалось от уровня мышей I/St. У последней линии отмечена тенденция к постепенному увеличению в легком количества CD4, CD8, CD19 и Mac3 положительных клеток к 16-й неделе после заражения. У мышей чувствительной линии B6 выявлено значительное превышение уровня интерлейкинов: IFN γ , TNF α и IL-12 на 8-ю и 16-ю недели после заражения по сравнению с резистентной линией I/St. Изучение уровня экспрессии генов некоторых хемокинов показало, что у зараженных мышей чувствительной линии B6 по сравнению с незараженным контролем выявлено увеличение экспрессии гена Csf3 (синтез G-CSF) в 10,6 раза на 8-й неделе и в 4 раза на 13-й и 16-й неделях после заражения. Выявлено увеличение экспрессии генов, ответственных за синтез факторов привлечения нейтрофилов: Xcr1 в 5,6 раза на 3-й неделе, в 10,5 раза на 8-й неделе, в 8 раз на 13-й неделе и в 2,6 раза на 16-й неделе после заражения; MIP-2 в 2,8 раза на 13-й неделе, а на 16-й неделе в 14 раз и KC лишь на 16-й неделе после заражения в 7,5 раза. У резистентной линии мышей I/St выявлены значительные отличия. Уровень экспрессии указанных выше генов в основном не отличался от незараженного контроля. Исключение составил ген Csf3, активность которого была выше в 3,3 раза на 3-й неделе после заражения. Уровень экспрессии гена MIP-2 был снижен в 3 раза на 8-й неделе.

ВЛИЯНИЕ ФАКТОРОВ ФИЗИЧЕСКОЙ ТЕРАПИИ НА СОСТОЯНИЕ ИММУННОЙ СИСТЕМЫ

Базарный В.В.

Уральская государственная медицинская академия, г. Екатеринбург, Россия

Иммунореабилитация является полноправной составной частью восстановительной медицины. В связи с этим сохраняется актуальность поиск новых иммуноориентированных технологий восстановительного лечения, что определило цель работы – проанализировать влияние ультразвука (УЗ), магнитолазерной терапии (МЛТ) и динамической электронейростимуляции (ДЭНС) на некоторые показатели морфофункционального состояния иммунной системы.

В экспериментальном исследовании на крысах указанные физические факторы использовали на различных экспериментальных моделях (стресс, перелом трубчатых костей, кожная рана). Для оценки состояния иммунной системы использовали комплекс тестов, включающий подсчет количества иммунокомпетентных клеток в костном мозге и крови, соотношение Т- и В-зависимых зон в селезенке и лимфатических узлах, определение функционально-метаболической активности нейтрофилов и концентрации некоторых острофазовых белков (СРБ, церулоплазмин, альбумин).

Воздействие физических факторов приводило к стимуляции Т-клеточного звена иммунитета, а МЛТ вызывала также и активацию фагоцитов. УЗ и МЛТ оказали

заметное противовоспалительное действие, у ДЭНС этот эффект был заметно менее выражен.

При воздействии всех физических факторов на область поврежденной ткани было отмечено увеличение доли лимфоцитов в зоне повреждения.

Таким образом, изученные физиотерапевтические воздействия (МЛТ, УЗ, ДЭНС) обладают схожими во многом иммуотропными эффектами, оказывают как системное, так и локальное иммуностимулирующее воздействие, степень которого может меняться в зависимости от особенностей физического фактора.

ВЛИЯНИЕ «ЦИТОФЛАВИНА» НА ФУНКЦИОНАЛЬНУЮ АКТИВНОСТЬ ИММУНОКОМПЕТЕНТНЫХ КЛЕТОК ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ ДИАБЕТЕ

Биличенко С.В., Саватеева-Любимова Т.Н., Саватеев А.В.

ФГУН «Институт токсикологии» ФМБА РФ, Санкт-Петербург, Россия

Введение. В настоящее время общепризнана роль гипергликемии в развитии поздних диабетических осложнений. Однако наряду с этим ведущим фактором другими механизмами повреждающего действия являются накопление свободных радикалов, способных изменять структуру ДНК и вызывающих цитотоксическое действие, недостаточность антиоксидантной системы и активация аутоиммунного процесса.

Цель исследования: изучение эффективности нового отечественного препарата «Цитофлавин», обладающего антиоксидантными и антигипоксическими свойствами, в условиях экспериментального диабета. В задачи исследования входило изучение влияния «Цитофлавина» на гликемические показатели, липидный профиль (общий холестерин, триглицериды, ЛПОНП, ЛПВП), процессы ПОЛ, состояние антиоксидантной системы, функциональную активность спленоцитов в сравнении с α -липоевой кислотой.

Материалы и методы. Эксперименты выполнены на 80 белых крысах-самцах стандартной массой 180-200 г. Развитие диабета моделировали путем п/к введения аллоксангидрата («Хемапол», Чехия) в дозе 150 мг/кг голодавшим в течение суток крысам, затем в течение 5 дней в/ж вводили «Цитофлавин» и липоевую кислоту в дозах 100 и 20 мг/кг соответственно. В ходе эксперимента фиксировали уровни глюкозы, общих липидов, триглицеридов, липопротеидов и холестерина сыворотки крови, показатели процессов перекисного окисления липидов

(ПОЛ) и антиоксидантной защиты, уровень пролиферативной активности и апоптоза лимфоцитов селезенки. Биохимические показатели определяли общепринятыми методами. Функциональное состояние клеток и уровень апоптоза в культуре лимфоцитов, выделенных из селезенки экспериментальных животных, изучали методом МТТ-теста по индексу пролиферативной активности при добавлении лимфоцитарных митогенов и при окрашивании ДНК флюоресцирующим красителем Hoechst 33342. Методом флюоресцентной микроскопии оценивали соотношение клеток с нормально и апоптотически расположенной в ядре ДНК. Для позитивного контроля к культуре клеток добавляли смесь TNF α в концентрации 500 Ед/мл и актиномицина Д в концентрации 1 мг/мл. Спленоциты получали путем гомогенизации и фильтрации селезенки.

Результаты. Установлено, что «Цитофлавин», незначительно влияя на показатели углеводного обмена, практически полностью нормализовал состояние липидного обмена, системы ПОЛ и антиоксидантной защиты, нарушенные вследствие воздействия диabetогена – аллоксана. Как следует из данных, представленных в таблице, «Цитофлавин» оказал выраженное позитивное действие в отношении повышенного уровня функциональной активности спленоцитов.

Заключение. Новый отечественный препарат «Цитофлавин» может быть включен в комплексную терапию сахарного диабета с целью профилактики развития поздних диабетических осложнений. В основе его позитивного действия лежит нормализующее влияние на процессы липидного обмена, окислительно-восстановительные реакции и функциональную активность иммунокомпетентных клеток.

МАКРОФАГИ КАК ВОЗМОЖНЫЕ РЕГУЛЯТОРЫ ДЕДИФФЕРЕНЦИРОВКИ КЛЕТОК ПЕЧЕНИ И ПОЧЕК ПРИ ПОВРЕЖДЕНИИ ОРГАНОВ

Юшков Б.Г., Брыкина И.А., Крохина Н.Б.

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

Одним из вероятных механизмов, обеспечивающих репаративную регенерацию тканей, является дедифференцировка и пролиферация оставшихся неповрежденными клеток. В настоящее время признано, что макрофаги способны регулировать неиммунологические реакции организма и, в частности, регенераторные процессы.

ТАБЛИЦА. ВЛИЯНИЕ «ЦИТОФЛАВИНА» И α -ЛИПОЕВОЙ КИСЛОТЫ НА УРОВЕНЬ ПРОЛИФЕРАТИВНОЙ АКТИВНОСТИ СПЛЕНОЦИТОВ И УРОВЕНЬ АПОПТОЗА В НИХ (К ТЕЗИСАМ БИЛИЧЕНКО С.В. И ДР.)

Экспериментальные группы	Уровень пролиферативной активности		Уровень апоптоза
	Индекс реакции, $M \pm m$	% по отношению к интактным животным	% соотношения клеток
Интактные	1,25 \pm 0,03	100	2,00 \pm 1,23
Аллоксан (А)	1,45 \pm 0,03*	116	31,00 \pm 6,40*
А + «Цитофлавин»	1,22 \pm 0,06 [^]	98	6,20 \pm 0,58 [^]
А + α -липоевая к-та	1,36 \pm 0,06	109	14,75 \pm 3,43* [^]

Примечание. * – $p \leq 0,05$ по отношению к интактным животным; [^] – $p \leq 0,05$ по отношению к нелеченым животным.

Цель работы: изучить влияние системы фагоцитирующих мононуклеаров на содержание ранних предшественников клеток печени и почек при повреждении.

Материалы и методы. Исследования проводились на беспородных белых мышях массой 18-25 г. Для исследования было сформировано 5 групп животных по 10 особей в каждой группе. В первую вошли интактные мыши, во вторую – животные, которым была проведена частичная гепатэктомия по Хиггинсу и Андерсону, третью группу составили мыши, которым сразу после операции внутримышечно вводили стимулятор макрофагов – тамерит. Животным четвертой группы была проведена частичная левосторонняя нефрэктомия (удалена треть левой почки), а мышам пятой группы сразу после нефрэктомии был введен тамерит. Уровень восстановительных процессов оценивали через сутки после операции. Методом иммуногистохимии определяли количество гепатоцитов и канальцевых эпителиоцитов, экспрессирующих маркер CD117. Исследование материала лабораторных животных проводилось на парафинизированных срезах с использованием моноклонального антитела anti-mouse CD117 clone ACK2 (Millipore, USA). Для визуализации антиген-реактивных клеток использовали тест-систему Novolink™ Polymer Detection System (Novocastra Lab., Ltd). Оценку реакции проводили полуколичественным методом (от -/- до +/+++).

Результаты. При ИГХ исследовании CD117 в печени мышей выявлено мелкогранулярное DAB-позитивное окрашивание цитоплазмы 27% гепатоцитов, локализованных преимущественно перипортально и вокруг центральных вен; степень экспрессии расценена как слабая. 73% гепатоцитов не экспрессируют данный маркер. В почках мышей выявлена положительная реакция на CD117 в виде мелкогранулярного окрашивания эпителия канальцев преимущественно коркового слоя. Слабоположительная реакция обнаружена в 25% канальцев; в 2% канальцев обнаружена средняя степень экспрессии CD117. Канальцев с выраженной экспрессией обнаружено не было, а большая часть канальцевых эпителиоцитов (73%) не экспрессирует данный маркер. После удаления части органа наблюдается одинаковая реакция как со стороны печени, так и со стороны почек. Количество CD117 – гепатоцитов и канальцевых эпителиоцитов – достоверно снижается, тогда как число клеток со средней и выраженной экспрессией данного маркера растет. При стимуляции системы фагоцитирующих мононуклеаров (СФМ) тамеритом у животных третьей и пятой групп обнаружено статистически значимое снижение количества DAB-негативных клеток и рост числа позитивных клеток, как со средней, так и с сильной экспрессией CD117. Нужно отметить, что в почках данные изменения наиболее выражены в оперированном органе.

Заключение. Учитывая тот факт, что CD117 преимущественно экспрессируется примитивными клетками и участвует в процессах пролиферации и дифференцировки, можно предположить, что и в исследуемых органах CD117⁺ клетки также являются малодифференцированными и готовящимися к делению. Стимуляция СФМ вызывает активизацию данных процессов, вероятно, вследствие усиления выработки макрофагами биологически активных веществ.

КАЧЕСТВЕННЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ КРАСНОЙ КРОВИ У КРЫС ПОСЛЕ ЧАСТИЧНОЙ ГЕПАТЭКТОМИИ

Бриллиант С.А., Юшков Б.Г.

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

Общепризнанна роль печени в регуляции физиологической регенерации крови – прежде всего клеток эритроидного ряда. Однако практически не исследован вопрос о влиянии репаративных процессов в поврежденном органе как на его гемопозэрегулирующую функцию, так и на распределение эритроцитов в различных органах.

Целью работы являлось исследование изменений качественных характеристик эритроцитов в периферической крови, сосудах печени, почек, селезенки, в норме и после частичной гепатэктомии.

Материалы и методы. Эксперименты выполнены на белых беспородных крысах. Репаративную регенерацию печени вызывали удалением под эфирным наркозом 2/3 массы органа по методу G.M. Higgins, R.M. Anderson (1931). Животных забивали через 4 и 17 ч. Контролем служили интактные крысы. Эритроциты для анализа получали из хвостовой вены и артерии, а также сосудов печени, селезенки, почек. Красные клетки крови исследовали на гематологическом анализаторе Celly 70 Biocode Hycl и мазках крови. Определяли следующие показатели: средний объем и диаметр клеток. Об активности эритропоза судили по содержанию в крови ретикулоцитов и клеток с фетальным гемоглобином (окраска по Betke-Kleihauer). Полученные результаты в ходе эксперимента обрабатывались с помощью программ «Statistica 6.0» и «Microsoft Excel 7.0».

Результаты. Было установлено, что у интактных животных клетки с наибольшим диаметром депонированы в сосудах печени и селезенке.

Через 4 и 17 ч после резекции печени в периферической крови эритроциты представлены уменьшенными клетками (средний объем у интактных животных составляет $55,63 \pm 0,11$ фл; спустя 4 ч после резекции печени – $52,28 \pm 0,51$ фл, $p < 0,001$ и к 17 ч составляет $53,1 \pm 0,66$ фл, $p < 0,05$). Через 4 и 17 ч после операции в сосудах печени, селезенки также находятся мелкие клетки, в то время как в почках данный феномен развивается лишь к 17 ч. Наблюдается также уменьшение количества эритроцитов, содержащих фетальный гемоглобин в печени (в контроле – $173,4 \pm 8,7$ г/л, на 4 ч – $113,7 \pm 19,4$ г/л, $p < 0,05$ и к 17 ч после операции – $245,1 \pm 10,3$ г/л, $p < 0,001$) и селезенке (в контроле – $160,1 \pm 11,7$, спустя 4 ч – $79,4 \pm 26,9$, $p < 0,05$). В сосудах почек их количество уменьшается лишь к 17 ч. В указанные сроки наблюдения содержание ретикулоцитов достоверно снижается лишь в сосудах печени (в контроле – $291,2 \pm 7,5$ г/л, через 4 ч – $224,01 \pm 0,27$ г/л, $p < 0,001$, и через 17 ч после резекции – $215,06 \pm 18,41$ г/л, $p < 0,05$), вероятно, в результате выброса молодых эритроцитов из депо. В остальных исследованных сосудах содержание ретикулоцитов достоверно не изменяется.

Заключение. Таким образом, частичная гепатэктомия приводит к поступлению в циркуляцию мелких по размерам эритроцитов и задержке эритропоза. Качественные изменения клеток в наибольшей степени выражены в печени и селезенке.

МИКРОСПЕКТРОФЛУОРИМЕТРИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ ВЛИЯНИЯ «БЕМИТИЛА», «ТРЕКРЕЗАНА» И «ПОЛИОКСИДОНИЯ» НА ОКСИДАТИВНЫЕ ПРОЦЕССЫ В ИММУКОМПЕТЕНТНЫХ КЛЕТКАХ

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

Военно-медицинская академия, Санкт-Петербург,
Россия

Введение. В экспериментах *in vitro* методом люминесцентной микроскопии изучалось влияние «Бемитила», «Трекрезана» и «Полиоксидония» на состояние ключевых переносчиков электронов в дыхательной цепи митохондрий эукариотических клеток – окисленных форм флавопротеидов (ФП) и восстановленных пиридиннуклеотидов (НАДН). Известно, что относительные изменения параметров люминесценции НАДН и ФП позволяют судить о степени и направленности изменений состояния митохондриальных процессов в ответ на действие различных факторов.

Материалы и методы. Кровь для исследования забирали из сердца после предварительного внутрибрюшинного введения интактным крысам 0,5 мл 10% раствора тиопентала натрия; в качестве антикоагулянта использовали гепарин. Лимфоциты выделяли на градиенте плотности фиколл-уротраст ($\rho = 1,077$ г/мл), рабочая концентрация которых составляла 1×10^6 клеток в 1 мл. Измерение параметров люминесценции осуществлялось с помощью установки, включающей люминесцентный микроскоп ЛЮАММ-ИЗ, двухканальную спектрофотометрическую насадку и компьютеризованную систему обработки данных. Длина волны возбуждения – 365 нм, длины волн регистрации – 460 нм (НАДН) и 520 нм (ФП). Аналогичные исследования выполнены на перитонеальных и альвеолярных макрофагах, взятых у этих же животных. Параллельно изучалась антиоксидантная активность исследуемых фармакологических препаратов по изменению люцигенинзависимой хемилюминесценции (ХЛ) на хемилюминометре «Хемилум-1». Во всех случаях фармпрепараты вносили в среду клеток в объеме 10 мкл в следующих концентрациях: «Бемитил» и «Трекрезан» – по 0,25 мг/мл, «Полиоксидоний» – 500 мкг/мл.

Результаты исследования. Внесение в среду альвеолярных макрофагов, выделенных у интактных крыс, «Бемитила» сопровождалось снижением интенсивности флуоресценции НАДН на 47% и усилением на 32% флуоресценции флавопротеидов. Относительное изменение люминесценции НАДН/ФП, характеризующее состояние клеточного дыхания, возрастало до величины 2,51.

На фоне действия «Трекрезана» в альвеолярных макрофагах крыс, напротив, флуоресценция ФП снижалась на 15%, а НАДН по сравнению с исходным уровнем увеличивалась на 31%. Отношение флуоресценции НАДН/ФП снижалось. Внесение в среду альвеолярных макрофагов «Полиоксидония» сопровождалось более значительным по сравнению с «Трекрезаном» снижением флуоресценции ФП на 54% и увеличением флуоресценции НАДН на 49%.

Направленность реакции флуоресценции флавопротеидов и пиридиннуклеотидов по параметрам люминесценции в лимфоцитах интактных крыс на фоне действия «Бемитила», «Трекрезана», «Полиоксидония» и их комбинаций сохранялась, но имела менее выраженный характер. Так, например, на фоне действия «Бемитила» в лим-

фоцитах крови крыс интенсивность флуоресценции флавопротеидов была на 46% выше по сравнению с исходной (до инкубации с препаратом). При этом интенсивность флуоресценции НАДН в лимфоцитах снижалась на 23%, что сопровождалось увеличением почти в два раза отношения флуоресценции НАДН/ФП.

При исследовании влияния изучаемых препаратов на свободнорадикальные процессы *in vitro* установлено, что взаимодействие перитонеальных и альвеолярных макрофагов с «Бемитилом», «Трекрезаном» и «Полиоксидонием» обуславливало однонаправленные изменения ХЛ макрофагов, различающиеся по степени выраженности. Действие «Бемитила» сопровождалось более выраженным снижением интенсивности ХЛ.

Заключение. Таким образом, полученные данные свидетельствуют о том, что среди исследованных препаратов наибольшей антиоксидантной активностью обладает «Бемитил». По всей вероятности, именно это свойство бемитила как выраженного антиоксиданта и определяет выявленную особенность в направленности изменений соотношения ключевых переносчиков электронов дыхательной цепи митохондрий по сравнению с действием «истинных» синтетических иммуномодуляторов – «Трекрезана» и «Полиоксидония».

ВЛИЯНИЕ АКТИВАЦИИ МАКРОФАГАЛЬНОГО ЗВЕНА ИММУННОЙ СИСТЕМЫ НА СОСТОЯНИЕ СЕЛЕЗЕНКИ И ТИМУСА ПРИ АЛЛОКСАНОВОМ ДИАБЕТЕ

Булавинцева Т.С.¹, Медведева С.Ю.¹, Гетте И.Ф.¹,
Абидов М.Т.²

¹ Институт иммунологии и физиологии УрО РАН,
г. Екатеринбург, Россия

² Московская медицинская академия им. И.П. Сеченова,
Москва, Россия

Одним из хронических осложнений сахарного диабета (СД) является снижение иммунной защиты, причинами которого могут быть аутоиммунная агрессия в отношении гликозилированных белков, недоступность глюкозы для иммунокомпетентных клеток, отсутствие анаболического действия инсулина, катаболизм структурных белков органов иммунной системы в целях глюконеогенеза. Поскольку в возникновении и в развитии осложнений сахарного диабета проявляется действие иммунных механизмов, актуальным является применение иммуномодуляторов для коррекции состояния органов иммунной системы.

Цель работы: выявить возможности коррекции патологических изменений органов иммунной системы, вызванных аллоксановым диабетом, путем воздействия на макрофаги препаратом «Тамерит».

Материалы и методы. Эксперимент был проведен на 30 беспородных белых крысах массой 120-280 г, которых содержали на обычном рационе вивария. Животных разделили на 3 группы: 1 группа – интактные (10 крыс), 2 группа – контрольные животные с аллоксановым сахарным диабетом (10 крыс), 3 – группа животных с сахарным диабетом и воздействием препаратом «Тамерит». Раствор иммуномодулятора из расчета 2 мг/кг массы крысы вводили внутримышечно в течение 1 месяца. В плазме крови животных определяли содержание глюкозы, гликозилированного гемоглобина и мочевины с использованием стандартных наборов

реактивов «Витал-диагностикс» СПб., ФОСФОСОРБ и спектрофотометра СФ-56 ЛОМО-Спектр.

Гистологические препараты окрашивали гематоксилин-эозином, пирюфуксином по Ван-Гизону и Вейгерту и просматривали с помощью микроскопа МИС-400 («Micros», Австрия), описывали и проводили микрофотографирование.

Основные результаты. В крови животных с аллоксановым диабетом (группа 2) наблюдали достоверное увеличение содержания глюкозы, гликозилированного гемоглобина и мочевины в 5, 2 и 3 раза соответственно относительно уровня этих показателей у интактных животных ($p < 0,05$), что подтверждает развитие у животных сахарного диабета. У животных с аллоксановым СД наблюдали уменьшение массы тела на 19% за два месяца по сравнению с животными интактной группы того же возраста. При этом достоверно снижалась также и масса органов иммунной системы: селезенки на 33,4%, тимуса на 51,7% ($p < 0,05$).

При гистологическом исследовании препаратов крыс с аллоксановым диабетом наблюдали разрушение большей части лимфоидных фолликулов в селезенке, стирание границ между красной и белой пульпой. Обнаруженные в белой пульпе структурные изменения свидетельствуют о нарушении дифференцировки Т- и В-лимфоцитов. При гистологическом исследовании тимуса экспериментальных животных с аллоксановым диабетом было обнаружено, что границы между корковым и мозговым веществом в большинстве случаев не определяются. Клеточность коркового вещества резко снижена. Выявлены тимоциты с признаками деструкции. Строма оголена. Просвет сосудов мозгового вещества расширен. Клетки эндотелия сосудов мозгового вещества набухшие, часть их десквамирована в просвет сосуда.

У животных 3 группы наблюдалось снижение уровня характерных для СД показателей: глюкозы, гликозилированного гемоглобина и мочевины. После введения тамерита нормализовалась общая масса тела, масса тимуса и селезенки. При гистологическом исследовании наблюдали практически полное восстановление морфологической структуры селезенки: границы между красной и белой пульпой четкие, в лимфоидных фолликулах отмечаются хорошо контурированные зоны, под капсулой органа определяется ретикулярная строма, обедненная клеточными элементами, т.е. происходит восстановление кроветворной функции органа. При лечении препаратом тамерит крыс, больных сахарным диабетом, структура тимуса также полностью восстанавливается и соответствует гистологической норме.

Вывод. Таким образом, полученные данные свидетельствуют об эффективности использования модулятора макрофагов – препарата «Тамерит» в целях регенерации органов иммунной системы при аллоксановом диабете.

РЕКОМБИНАНТНАЯ КОНСТРУКЦИЯ БТШ70-ЛПС ИНДУЦИРУЕТ ЗАЩИТУ МЫШЕЙ ОТ *SALMONELLA TYPHIMURIUM*. ОЦЕНКА ПРОТЕКТИВНОЙ РОЛИ БЕЛКА ТЕПЛООВОГО ШОКА-70 И ЛИПОПОЛИСАХАРИДА

Воробьев Д.С., Семенова И.Б.

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

В настоящее время установлено, что рекомбинантный белок теплового шока (БТШ) активизирует врожденный иммунитет и создает антиинфекционную защиту. Однако отдельными авторами высказывается мнение, что защит-

ный эффект БТШ обусловлен содержанием в нем примеси липополисахарида (ЛПС).

Цель: исследовать протективную активность рекомбинантной конструкции БТШ70-ЛПС (ркБТШ70-ЛПС) против *S. typhimurium* инфекции у мышей и определить роль каждого элемента конструкции – БТШ70 и ЛПС – в создании противoinфекционной защиты.

Материал и методы. Белым беспородным мышам вводили: 1) ркБТШ70-ЛПС внутрибрюшинно трехкратно ежедневно в дозе 10 мкг/мышь и однократно в дозе 100 мкг/мышь; 2) конструкцию, обработанную полимиксином В (ркБТШ70-ЛПС)РМВ для связывания ЛПС по принятой методике (Н. Tsuzuki et al.), – трехкратно ежедневно в дозе 10 мкг/мышь и однократно в дозе 100 мкг/мышь; 3) конструкцию, в которой белок был подвергнут кипячению в течение 30 минут (ркБТШ70-ЛПС)К, согласно Y. Bulut et al. – трехкратно ежедневно в дозе 10 мкг/мышь и однократно в дозе 100 мкг/мышь; 4) ЛПС (*E. coli* К-235) в дозе 0,0266 мкг/мышь однократно; 5) РМВ в дозе 2,66 мкг/мышь однократно. Через 24 ч после однократного или последнего введения ркБТШ70-ЛПС мышью заражали *S. typhimurium* 415 внутрибрюшинно в 0,5 мл физиологического раствора в дозе 63 LD₅₀/мышь. Наблюдение за животными проводили в течение 21 дня. В качестве контроля служили зараженные не иммунизированные мыши.

Результаты. Нами продемонстрировано, что ркБТШ70-ЛПС при введении мышам за 24 ч до заражения индуцирует резистентность к *S. typhimurium* инфекции. Защита формировалась после трехкратного введения 10 мкг/мышь (выжили 80% животных) или одной инокуляции 100 мкг/мышь (выжили 40% животных) ркБТШ70-ЛПС при 90% гибели мышей в контроле. Разрушение БТШ70 при кипячении конструкции отменяло протективный эффект. После связывания ЛПС полимиксином В защитные свойства ркБТШ70-ЛПС сохранялись, но выявлялись только при многократном введении 10 мкг/мышь этого препарата (выжили 40% животных). ЛПС *E. coli* в дозе 0,0266 мкг/мышь и РМВ не влияли на течение *S. typhimurium* инфекции у мышей.

Заключение. Показано, что ркБТШ70-ЛПС эффективно защищает мышью от бактериальной инфекции *S. typhimurium*. При связывании ЛПС полимиксином В формируется менее выраженная защита, а разрушение БТШ70 в ркБТШ70-ЛПС с помощью кипячения отменяет протективный эффект.

РЕАКЦИЯ ТУЧНЫХ КЛЕТОК НА ИШЕМИЮ

Гафарова Р.К.

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

В современной ангиологии особое место занимает проблема образования и роста кровеносных сосудов. Всестороннее исследование механизмов регуляции ангиогенеза позволяет обосновать совершенно новое направление в лечении ряда заболеваний – терапевтический ангиогенез.

В настоящее время широкое распространение получило представление, что в реакции сосудобразования важную роль играют тучные клетки и их секретируемые медиаторы. Так, Ching et al. (2006) показали, что мастоциты не только аккумулируются вокруг пограничной полосы опухоли, но при этом возрастает степень

их дегрануляции, и в связи с этим отмечается активный рост сосудов. А Ribatti et al. (2002), в свою очередь, выявили отчетливую корреляционную связь между количеством сосудов в костном мозге и содержанием в нем триптазо-реактивных тучных клеток.

Цель работы: оценить изменения плотности капилляров, количества мастоцитов и коэффициента их дегрануляции в ишемизированной мышце на разные сроки.

Материалы и методы. Эксперименты выполнены на белых беспородных мышцах самцах массой 25 г. Ишемию задней конечности у мышей моделировали путем наложения лигатур с последующей перерезкой бедренной артерии. Животных выводили из эксперимента путем деканализации на 3-и и 9-е сутки после операции. Контролем служили мышцы интактных животных.

Сосуды выявляли с помощью иммуногистохимического окрашивания эндотелиоцитов в гистологических препаратах. Для этого ацетон-фиксированные замороженные срезы мышц обрабатывали моноклональными антителами anti-mouse CD105 clone MJ7/18 (BD, USA). Для визуализации антигенреактивных клеток использовали тест-систему Novolink™ Polymer Detection System (Novocastra Lab., Ltd).

Тучные клетки в мышцах окрашивали азуром II. Статистическую обработку данных проводили с помощью программ «StatSoft Statistica 6.0». Для проверки гипотезы об однородности двух независимых выборок использовался U-критерий Манна-Уитни.

Результаты. Морфометрические исследования свидетельствуют, что общее количество сосудов в зоне ишемии уже через 3 дня после перерезки бедренной артерии достоверно снижается ($103,6 \pm 8,16$, $p < 0,05$) по сравнению с интактной мышцей ($147,8 \pm 13,1$) и сохраняется на низком уровне вплоть до 9-х суток ($86,67 \pm 5,5$, $p < 0,001$).

Изменения со стороны тучных клеток характеризуются достоверным увеличением их количества на 3-и ($18,1 \pm 3,45$; $p < 0,05$) и 9-е ($22,79 \pm 7,77$; $p < 0,05$) сутки ишемии по сравнению с интактной мышцей ($9,19 \pm 0,9$). Кроме количественных изменений наблюдается и увеличение коэффициента дегрануляции тучных клеток на 3-и ($58,53 \pm 10,45$; $p < 0,05$) и 9-е ($38,54 \pm 3,49$; $p < 0,05$) сутки после операции по сравнению с интактной мышцей ($18,87 \pm 6$). В то же время эти показатели на оба срока между собой достоверных отличий не имеют.

Таким образом, перерезка бедренной артерии приводит к миграции тучных клеток в область ишемии и повышению их секреторной активности, проявляющуюся увеличением степени их дегрануляции.

Полученные данные свидетельствуют о возможном участии тучных клеток в процессах ангиогенеза при ишемии. Однако механизмы этих явлений требуют дополнительных исследований.

В1-ЛИМФОЦИТЫ КАК ФАКТОР ПАТОГЕНЕЗА ИНФЕКЦИИ, ВЫЗВАННОЙ ВИРУСОМ КЛЕЩЕВОГО ЭНЦЕФАЛИТА

Ганшина И.В., Ожерелков С.В., Пронин А.В., Санин А.В.

*ГУ НИИЭМ им. Н.Ф. Гамалеи РАМН, г. Москва, Россия
ГУ Институт полиомиелита и вирусных энцефалитов им. М.П. Чумакова РАМН, Москва, Россия*

В настоящее время проблемы расшифровки патогенеза и поиска оптимальных методов лечения вирусных

инфекций центральной нервной системы (ЦНС) требуют интенсивного изучения.

Выявлена неоднозначная роль иммунной системы в патогенезе названных заболеваний. Факторы иммунитета могут способствовать выздоровлению, предотвращая инфицирование ЦНС, ограничивая репликацию вируса и/или вызывая элиминацию последнего [Roehrig et al., 2001; Zinkernagel et al., 2001; Diamond et al., 2003]. Возможно также патогенное воздействие факторов иммунитета на ЦНС, обусловленное прямым повреждением клеток в процессе элиминации вируса и/или возникновением нарушений аутоиммунной патологии [Хозинский и др., 1989; Licon Luna et al., 2001; Wang et al., 2003; Růžek et al., 2009].

В числе популяций иммунокомпетентных клеток, играющих важную роль в регуляции аутоиммунитета, следует упомянуть В1-лимфоциты. Данные клетки характеризуются высокой частотой аутореактивности, в том числе в отношении антигенов, присутствующих в нервной ткани (фосфатидилхолин, Thy-1) [Hardy, Hayakawa, 1994]. Учитывая существенную роль В1-лимфоцитов в патогенезе ряда аутоиммунных [Murakami et al., 1994, 1995; Kendall et al., 2004] и инфекционных [Baumgarth et al., 2000; Paciorowski et al., 2000; Chen et al., 2003] заболеваний, мы начали изучение роли В1-лимфоцитов в патогенезе клещевого энцефалита (КЭ) мышей линии BALB/c.

В работе использованы интактные и В1-дефицитные животные. В1-лимфоциты элиминировали методом гипотонического шока [Murakami et al., 1995]. Заражение вирусом клещевого энцефалита (ВКЭ; вакцинный штамм Софьин) проводилось однократно внутрибрюшинно в дозе 10^2 БОЕ₅₀. Вирус использовали в виде суспензии головного мозга заболевших мышей-сосунков, зараженных интрацеребрально. ВКЭ титровали в культуре клеток СПЭВ методом бляшкообразования, исходный титр вируса составлял 10^9 БОЕ₅₀/мл. Наблюдение за животными осуществляли в течение 21 суток после заражения. Клинические признаки КЭ (парезы или параличи с последующей гибелью) выявляли с 6 по 17 сутки после заражения ВКЭ. По окончании экспериментов рассчитывали показатели летальности (в процентах) и средней продолжительности жизни (СПЖ; в сутках).

С целью выявления инфекционного вируса у выживших после заражения ВКЭ интактных и В1-дефицитных мышей на 21 сутки после инфицирования исследованы головной мозг и селезенки животных. Выделение ВКЭ проводили методом бляшкообразования в культуре клеток СПЭВ.

Выявлено двукратное снижение показателя летальности (58-60% – в группах контроля, 30% – в группе В1-дефицитных животных) в остром периоде КЭ и существенное удлинение СПЖ (8,3 суток – в группах контроля, 14,1 суток – в группе В1-дефицитных животных) в результате элиминации В1-лимфоцитов.

В то же время значительно увеличилась частота выявления инфекционного вируса (20% – в группах контроля, 55% – в группе В1-дефицитных животных) у мышей, выживших после заражения ВКЭ, причем в группе В1-дефицитных животных отмечены более высокие титры вируса ($1,6-2,7$ lg БОЕ₅₀, в группах контроля – $1,6-1,7$ lg БОЕ₅₀).

Очевидно, клетки В1-популяции служат фактором повышения тяжести течения острого периода КЭ, но препятствуют переходу инфекции в хроническую форму. Вероятно, В1-лимфоциты и/или продуцируемые ими

гуморальные факторы регулируют кинетику инфицирования ЦНС и репликации вируса либо характер и интенсивность реакции воспаления в головном и спинном мозге. Уточнение роли В1-лимфоцитов в патогенезе вирусных инфекций ЦНС будет предметом наших дальнейших исследований.

ИССЛЕДОВАНИЕ ИММУНОТРОПНЫХ СВОЙСТВ НЕКОТОРЫХ ПРИРОДНЫХ И СИНТЕТИЧЕСКИХ ФЕНОЛЬНЫХ СОЕДИНЕНИЙ

Гетманенко А.Ю., Плетнёва И.В.,
Гумилевский Б.Ю., Симонян А.В.

ГОУ ВПО Волгоградский государственный медицинский университет, г. Волгоград, Россия

В настоящее время в медицинской практике важное место принадлежит лекарственным средствам природного происхождения. Среди них особое место занимают бальнеологические средства, поскольку обладают множественными эффектами, в том числе иммуностропными и практически не имеют побочных эффектов. Новые бальнеологические средства «Аквалим» и «Эльгон» получены при комплексной переработке иловой лечебной грязи озера Эльгон, в их состав входят природные биостимуляторы. Синтетический препарат «ГМБЦ-1» является структурным аналогом куркумина. Для них показаны противовоспалительные, антирадикальные свойства, однако влияние на иммунную систему остается до сих пор не изученным. Поэтому целью настоящего исследования явилось исследование иммуностропных свойств изучаемых средств.

Для этого провели исследование влияния препарата «ГМБЦ-1» на образование специфических антител к эритроцитам барана у 20 беспородных крыс-самцов, которые были случайным образом разделены на 2 равные группы. Одна группа была оставлена в качестве контрольной, другой ежедневно производилось внутрибрюшинное введение 0,1% раствора препарата из расчета 5 мг/кг массы тела; контрольной группе вводился стерильный физиологический раствор. На 3-й день введения препарата животным всех трех групп было введено внутрибрюшинно по 0,1 мл суспензии эритроцитов барана. Введение препарата было продолжено в течение 14 дней после иммунизации. На 7-й, 14-й день было проведено взятие периферической крови из хвостовой вены для определения показателей общего анализа крови и уровней сывороточных антител к эритроцитам барана. Для оценки влияния препаратов «ГМБЦ-1» и «Аквалим» на неспецифический иммунный ответ была оценена фагоцитарная активность нейтрофилов в стандартном тесте оценки ФП и ФЧ *in vitro* и в тесте восстановления НСТ в присутствии препаратов (100 мкг/мкл) и без такового.

Выполненные исследования позволили выяснить, что иммунизация контрольной группы крыс эритроцитами барана приводит к появлению на 14-й день иммунизации специфических антител в титрах от 1:35 до 1:47. У крыс, получавших средство «ГМБЦ-1», уровни антител к эритроцитам барана были значимо выше контрольных (титр 1:47-1:85). При исследовании влияния препарата на фагоцитоз оказалось, что «ГМБЦ-1» приводит к значимому увеличению активности фагоцитов (индекса ФП) ($78 \pm 3,2$ против $64 \pm 2,8$ в контроле) без влияния на ФЧ и показатели в тесте восстановления НСТ. Таким образом, можно

заключить, что препарат «ГМБЦ-1», усиливает гуморальный иммунитет, возможно, за счет активации механизмов врожденного иммунитета, это может быть полезно при местном применении препарата для лечения инфицированных поврежденных барьерных тканей организма. Исследование влияния «Аквалима» на функции фагоцитов позволили выявить полное угнетение восстановления НСТ в присутствии препарата. Значимого влияния на активность фагоцитов препарат не оказывал, поскольку ФП и ФЧ не изменялись под влиянием «Аквалима» (ФП $66 \pm 3,1$ против $62 \pm 2,2$ в контроле, ФЧ $2,1 \pm 0,1$ против $2,2 \pm 0,1$ в контроле). Такое влияние препарата можно объяснить его антиоксидантными свойствами, которые блокируют образование активных форм кислорода при фагоцитозе и не дают НСТ восстанавливаться. Таким образом, можно заключить, что исследуемые средства оказывают разностороннее иммуномодулирующее воздействие и могут быть рекомендованы для совместного топического применения, в комплексе для лечения воспалительного процесса с выраженной воспалительной деструкцией ткани и риском бактериального инфицирования.

ВОЗМОЖНЫЕ МЕХАНИЗМЫ ПРЯМЫХ И ОПОСРЕДОВАННЫХ ЭФФЕКТОВ ХОРИОНИЧЕСКОГО ГОНАДОТРОПИНА, КОНТРОЛИРУЮЩЕГО ФАГОЦИТАРНУЮ АКТИВНОСТЬ ЛЕЙКОЦИТОВ

Горбунова О.Л., Ширшев С.В.

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

Основным гормоном плаценты, протектирующим развитие беременности, является хорионический гонадотропин (ХГ). Показано, что ХГ имеет специфические рецепторы на различных типах иммунокомпетентных клеток и оказывает существенное влияние на адаптивные и неспецифические защитные реакции организма. ХГ стимулирует секрецию прогестерона (Pr) и эстрадиола (E2) и свои иммуномодулирующие эффекты реализует в комплексе с этими гормонами. В то же время направленность иммунорегуляторного действия ХГ зависит не только от уровня половых стероидов, но и активационного статуса клетки-мишени, важную роль в котором играют простагландины (ПГ).

Материалы и методы. Эксперименты проведены на мышцах-самках породы *Swiss* массой 20-22 г. На первом этапе изучали действие ХГ в краткосрочной культуре клеток перитонеального смыва и периферической крови в стандартных условиях и в условиях блокады циклооксигеназы (ЦОГ) и Ca^{2+} каналов L-типа. ХГ использовали в дозах 100 МЕ/мл и 10 МЕ/мл, соответствующих его среднему уровню в сыворотке крови беременных женщин в I и II-III триместры соответственно. Для блокады ЦОГ применяли диклофенак натрия. Ca^{2+} каналы L-типа инактивировали верапамилом. Периферическую кровь и перитонеальные макрофаги инкубировали в присутствии ХГ и/или ингибиторов и затем исследовали фагоцитарную активность клеток по поглощению формализированных эритроцитов барана (ФЭБ). На втором этапе исследовали эффекты ХГ на фагоцитарную активность клеток на фоне внутрибрюшинной иммунизации ЭБ в концентрации 10^8 клеток/мышь, которую проводили на 5-й день от начала инъекций ХГ. Экспериментальным группам ХГ вводили пятикратно подкожно

через день в дозах 200 и 20 МЕ/мышь, соответствующим концентрациям в эксперименте *in vitro*, контрольным животным инъецировали растворитель гормона. Для оценки гонадотропного действия ХГ в сыворотке крови определяли уровни E_2 и Рг иммуноферментным методом и титр специфических (IgM) к ЭБ в реакции прямой гемагглютинации. Исследовали эффекты ХГ и индуцированного им стероидного фона на фагоцитарную активность клеток у не иммунизированных животных. Статистическую обработку проводили по U-критерию Манна-Уитни и корреляционному анализу Спирмену.

Основные результаты. Установлено, что ХГ в системе *in vitro* вне зависимости от дозы угнетает фагоцитарную активность нейтрофилов и перитонеальных макрофагов. Данный эффект гормона связан с функционированием как Ca^{2+} каналов L-типа, так и активностью ЦОГ, т.к. на фоне селективных ингибиторов ХГ утрачивает свое депрессивное действие, а в ряде случаев меняет его на активирующее. Учитывая, что в макрофагах и нейтрофилах активация ЦОГ приводит к повышению секреции молекул ПГЕ₂, которые реализуют свое действие через EP2-рецепторы, связанные с аденилатциклазой, можно говорить о данной молекуле как вероятном аутокринном кофакторе, усиливающим депрессивный цАМФ-зависимый механизм действия ХГ. Ca^{2+} каналы L-типа также участвуют в потенцирующем действии, усиливая ХГ-депрессивный эффект гормона, активируя, по-видимому, аденилатциклазу фагоцитов, что дополняет цАМФ-зависимый гормональный сигнал. Моноциты крови, напротив, повышают свой фагоцитарный потенциал, при этом блокада ЦОГ практически не влияет на ХГ-активирующее действие. Блокада Ca^{2+} каналов L-типа нивелирует ХГ-стимулирующий эффект, способствуя низкой дозе ХГ в его реализации. Не исключено, что в данном случае ХГ взаимодействует с альтернативными Toll-подобными молекулами моноцитов, активация которых усиливается экзогенным Ca^{2+} флюксом. Различие эффектов ХГ *in vitro* на макрофаги и моноциты связано с неодинаковой чувствительностью фагоцитов к регулируемому действию ХГ, находящихся на различной стадии дифференцировки. При исследовании действия ХГ в системе *in vivo* выявлено, что инъекции ХГ не иммунизированным животным не влияют на фагоцитарную активность клеток, что связано с его гонадотропным действием. Введение ХГ повышает уровни E_2 и Рг в сыворотке крови мышей. На фоне иммунизации инъекции ХГ достоверно увеличивают фагоцитарную активность нейтрофилов крови и макрофагов. Положительные корреляции между уровнем E_2 , Рг и фагоцитарной активностью, указывают на прямое участие стероидов в ХГ-стимулирующей регуляции фагоцитарной активности на фоне иммунизации или нивелирования его депрессивных эффектов у интактных животных. При системном ответе на антиген уровень фагоцитарной активности зависит не только от непосредственного или опосредованного действия ХГ, но и от специфических антител, выступающими активаторами фагоцитарной реакции. Введение ХГ на фоне иммунизации повышает титр IgM, обладающими слабыми опсонизирующими свойствами, усиливая фагоцитоз благодаря фиксации на поверхности антигена комплемента. Выявлена прямая связь между увеличением уровня IgM и гормональной стимуляцией фагоцитоза.

Заключение. В целом выявлен сложный контроль со стороны ХГ за функциональной активностью клеток неспецифической резистентности. В системе *in vitro*

фагоцит-депрессивное действие ХГ обеспечивается функционированием Ca^{2+} каналов L-типа и ауто- или паракринным контролем ПГ. В условиях целостного организма ХГ либо не проявляет свойственных для него эффектов, либо оказывает оппозитное, стимулирующее действие. Если в первом случае иммунодепрессивную активность ХГ нивелируют индуцированные им половые стероиды, то во втором иммуностимулирующая активность связана не только с повышением уровня эндогенных стероидов, но и с появлением специфических IgM, активирующих фагоциты, формируя иммунные комплексы и, следовательно, усиливая чувствительность клеток к гормональным воздействиям.

ВЛИЯНИЕ ЭКЗОПОЛИСАХАРИДОВ *LACTOBACILLUS DELBRUECKII* SPP. *BULGARICUS* НА ЦИТОКИНОВЫЙ СТАТУС ЛАБОРАТОРНЫХ МЫШЕЙ

Горельникова Е.А., Полукаров Е.В., Карпунина Л.В., Тихомирова Е.И.

ФГОУ ВПО Саратовский государственный аграрный университет им. Н.И. Вавилова, г. Саратов, Россия
ФГОУ ВПО Саратовский государственный технический университет, г. Саратов, Россия

В последнее время большое внимание уделяется изучению функциональной роли экзополисахаридов (ЭПС). Согласно литературным данным [Kitazawa et al., 1996; Chabot et al. 2001; Ruiz-Bravo et al., 2001] некоторые бактериальные ЭПС, в том числе и ЭПС некоторых видов лактобацилл (*L. lactis* ssp. *cremoris*, *L. rhamnosus* RW-9595M), способны стимулировать синтез различных цитокинов: интерлейкина-1 (IL-1), интерлейкина-6 (IL-6), интерлейкина-12 (IL-12), фактора некроза опухоли- α (TNF α), интерферона- γ (IFN γ).

В настоящей работе было изучено влияние экзополисахаридов лаксарана Z, лаксарана 1596, лаксарана 1936 на цитокиновый статус лабораторных мышей. Продуктом данных ЭПС является *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus*. Лаксараны Z, 1596, 1936 представляют собой нейтральные экзополисахариды с молекулярной массой 140 кДа, 1700 кДа, 220 кДа соответственно.

Лаксараны Z, 1596 и 1936 вводили в концентрации 0,06 г/мл в объеме 0,2 мл внутривентриально беспородным белым мышам возраста 2-3 месяца, весом 18-20 г. Через 1 и 6 часов после введения ЭПС животных умерщвляли транслокацией шейных позвонков, брали кровь из сердца, получали сыворотку по общепринятой методике и определяли в ней содержание цитокинов TNF α , IFN γ IL-1 α , IL-4 методом иммуноферментного анализа с помощью стандартных тест-систем на основе моноклональных антител.

Содержание TNF α в сыворотке крови мышей через 1 час после введения лаксарана Z снижалось на 15 пкг/мл, а через 6 часов повышалось до уровня данного цитокина у интактных животных (контроль). Через 1 час после введения в организм животных лаксарана 1596 содержание TNF α увеличилось на 20 пкг/мл по сравнению с контролем, а через 6 часов уменьшалось на 16,8 пкг/мл по сравнению с контролем (41,4 пкг/мл и 24,6 пкг/мл соответственно). Содержание TNF α в сыворотке крови экспериментальных животных через 1 час после введения лаксарана 1936 достоверно увеличилось в 8 раз, а через 6 часов – в 6 раз.

Содержание $IFN\gamma$ в сыворотке крови экспериментальных животных при введении им лаксарана Z и лаксарана 1936 достоверно не отличалось от контрольных значений. Через 1 час после введения лаксарана 1596 содержание $IFN\gamma$ увеличилось в 1,5 раза, однако через 6 часов данный показатель был на уровне контроля. Содержание IL-4 в сыворотке крови при введении мышам лаксарана 1596 и лаксарана 1936 достоверно не отличалось от уровня контроля. При введении лаксарана Z содержание IL-4 уже через 1 час достоверно увеличилось в 3 раза по сравнению с контрольным значением (95,1 пкг/мл и 31,4 пкг/мл соответственно), а к 6 часам не отличалось от уровня контроля.

Содержание IL-1 α через 1 час после введения лаксарана Z достоверно увеличилось в 3 раза по сравнению с контролем (93,4 пкг/мл и 35,9 пкг/мл соответственно), а уже через 6 часов содержание данного цитокина было на уровне его концентрации в сыворотке крови интактных животных. Аналогичная картина наблюдалась при введении лаксарана 1596. При введении лаксарана 1936 содержание IL-1 α увеличилось по сравнению с контролем в 1,5 и 3 раза (через 1 и 6 часов соответственно).

Таким образом, показано, что лаксараны Z, 1596, 1936 оказывают влияние на содержание цитокинов в сыворотке крови лабораторных мышей. Полученные результаты доказывают возможное участие экзополисахаридов в регуляции цитокинового баланса и открывают перспективы изучения их применения на фоне различных инфекционных заболеваний в качестве профилактических иммуномодулирующих препаратов.

ЧИСЛЕННОСТЬ СТРОМАЛЬНЫХ КЛЕТОК-ПРЕДШЕСТВЕННИКОВ КОСТНОГО МОЗГА МЫШЕЙ И ЭКСПРЕССИЯ ГЕНОВ ЦИТОКИНОВ В ПЕРВИЧНЫХ КУЛЬТУРАХ КОСТНОГО МОЗГА МЫШЕЙ В РАЗНЫЕ СРОКИ ПОСЛЕ ИММУНИЗАЦИИ ЖИВОТНЫХ МИКРОБНОЙ МАССОЙ *S. TYPHIMURIUM*

Горская Ю.Ф., Мезенцева М.В., Шаповал И.М., Данилова Т.А., Наровлянский А.Н., Нестеренко В.Г.
НИИ Эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф. Гамалеи РАМН, Москва, Россия

Показано, что стромальные клетки (СК) подавляют иммунный ответ лимфоцитов на трансплантационные антигены и митогены *in vitro* и *in vivo* при введении СК в организм. Однако поскольку известно, что СК кровеносных и лимфоидных органов обеспечивают специфическое микроокружение для пролиферации и диф-

ференцировки гемопоэтических и лимфоидных клеток, следует, по-видимому, ожидать, что эти клетки могут принимать позитивное участие в поддержании иммунного ответа в организме. Действительно, показано, что иммунизация животных приводит к резкому увеличению численности стромальных клеток-предшественников (КОК-Ф) в лимфатических узлах (до нескольких десятков раз) и селезенке (до 10 раз). При этом указанное увеличение, по-видимому, отнюдь не мешает реализации иммунного ответа на территории соответствующих органов. Таким образом, вопрос о том, поддерживают ли резидентные СК лимфоидных органов иммунный ответ в организме в отличие от СК, введенных в организм, остается открытым.

В связи с изложенным в данной работе были поставлены следующие задачи: определить, как влияет иммунизация животных *S. typhimurium*: 1) на эффективность клонирования (ЭКО-Ф) и содержание КОК-Ф в костном мозге в разные сроки после иммунизации; 2) на синтез мРНК противо- и провоспалительных цитокинов в клетках первичных культур костного мозга иммунных мышей по сравнению с интактными.

В экспериментах использовали взрослых мышей линии СВА. Часть мышей была иммунизирована внутрибрюшинно микробной массой *S. typhimurium* по 400 мкг в 0,4 мл физиологического раствора. Для определения ЭКО-Ф клетки костного мозга интактных мышей и мышей через 1, 3, 7 и 15 дней эти культуры состояли из дискретных колоний стромальных фибробластов с примесью макрофагов. По числу выросших колоний определяли ЭКО-Ф, то есть число колоний, содержащих не менее 50 фибробластов, образующееся при эксплантации 106 клеток. Для определения экспрессии генов цитокинов в культурах клетки костного мозга интактных и иммунизированных мышей экспантировали по 5×10^6 - 1×10^7 на флакон. Через 8-10 дней такие культуры состояли из подслоя фибробластов (образовавшегося вследствие сливного роста колоний стромальных клеток-предшественников); в культурах присутствовали также макрофаги и некоторое количество гемопоэтических и лимфоидных клеток. Определение активности мРНК 10 цитокинов – интерферонов ($IFN\alpha$ и $IFN\gamma$), интерлейкинов (IL-1 β , IL-2, 4, 6, 10, 12, 18) и фактора некроза опухолей (TNF α) в клетках культур проводили с использованием методов обратной транскрипции и полимеразной цепной реакции (ОТ-ПЦР) (таблица).

Введение микробной массы *S. typhimurium* в организм вызывало существенное (трех-четырёхкратное) увеличение ЭКО-Ф и, соответственно, содержания стромальных

ТАБЛИЦА. ВЛИЯНИЕ ИММУНИЗАЦИИ *S. TYPHIMURIUM* НА СИНТЕЗ мРНК ЦИТОКИНОВ В ПЕРВИЧНЫХ КУЛЬТУРАХ КОСТНОГО МОЗГА ИММУННЫХ МЫШЕЙ (↑ – ПОЯВЛЕНИЕ мРНК, ↓ – ИСЧЕЗНОВЕНИЕ мРНК) (К ТЕЗИСАМ ГОРСКОЙ Ю.Ф. И ДР.)

Срок после иммуниз. (сут.)	$IFN\alpha$	$IFN\gamma$	IL-1 β	IL-2	IL-4	IL-6	IL-10	IL-12	IL-18	TNF α
Интактные	+	+	-	+	-	-	+	+	+	-
1	+	- ↓	+ ↑	+	-	+ ↑	+	+	+	+ ↑
3	+	+ ↑	- ↓	+	-	+	↓	+	- ↓	+
6	+	+	-	+	+ ↑	+ ↓	+	+	+ ↑	+

Примечание. «+» – наличие мРНК цитокина, «-» – отсутствие мРНК цитокина.

клеток-предшественников в костном мозге бедра мышей, достигая максимума на 1-3-е сутки и снижаясь до нормального уровня к 7-15-му дню после иммунизации. Одновременно в культурах костного мозга, взятого от иммунизированных животных, в отличие от интактных отмечалось появление экспрессии генов провоспалительных цитокинов — IL-1 β (через сутки после иммунизации), IL-6 (на 1-3-е сутки) и TNF α (на 1, 3, 6-е сутки), а также IFN α (на 1-3-е сутки). Экспрессия гена IFN γ падала на 1-е сутки, IL-18 — на 3-е сутки, IFN α — на 6-е сутки после иммунизации животных. Экспрессия гена противовоспалительного цитокина IL-4 имела место на 6 сутки после иммунизации. Таким образом, в данной системе не было отмечено никаких признаков подавления иммунного ответа со стороны стромальных клеток. Напротив, из полученных данных следует, что стромальный компонент кроветворных и лимфоидных органов в организме в ответ на введение бактериальных антигенов вырабатывает вектор воздействий, направленный не на супрессию иммунного ответа, а на его стимуляцию и развертывание. Полученные данные указывают на возможность позитивного участия резидентных стромальных клеток в реализации иммунного ответа в организме.

СРАВНИТЕЛЬНАЯ ОЦЕНКА ИММУНОМОДУЛИРУЮЩЕЙ АКТИВНОСТИ ПРЕПАРАТОВ ЧЕЛОВЕЧЕСКОГО И ТУБЕРКУЛЕЗНОГО РЕКОМБИНАНТНЫХ БЕЛКОВ ТЕПЛОвого ШОКА HSP70

Гукасова Н.В.¹, Данилевский М.И.²,
Москалева Е.Ю.¹, Морозова Н.С.¹, Гороховец Н.В.¹,
Попова О.Н.¹, Северин С.Е.^{1,2}

¹ Московский научно-исследовательский институт
медицинской экологии, Москва, Россия

² Московская медицинская академия им. И.М. Сеченова,
Москва, Россия

Введение. Белки теплового шока (heat shock proteins — HSP) играют важную роль в формировании противоинфекционного, противовирусного и противоопухолевого иммунного ответа. HSP связываются с антигенными полипептидами, способствуют их проникновению в антигенпредставляющую клетку и образованию комплекса пептид-HLA I класса, что является необходимым этапом развития Т-клеточных антигенспецифических иммунных реакций. Способность HSP образовывать комплексы с опухолеспецифическими пептидами позволила использовать эти белки для создания противоопухолевых вакцин. Иммуногенность таких вакцин обеспечивается инициацией как специфических, так и неспецифических иммунных реакций. Считается, HSP являются для иммунной системы своеобразным сигналом опасности, в ответ на который происходит активация неспецифического иммунитета.

Целью данной работы явилось сравнение иммуномодулирующей активности препаратов человеческого и туберкулезного рекомбинантных HSP70 (rhHSP70 и gmHSP70 соответственно). В задачи работы входила оценка влияния препаратов HSP70 на функциональную активность дендритных клеток (ДК) и NK-клеток.

Материалы и методы. rhHSP70 и gmHSP70 выделяли из ранее полученных методами генной инженерии штаммов продуцентов *E. coli*. и очищали с использованием металлхелатной хроматографии. ДК выделяли из моноцитов

крови в соответствии со стандартным протоколом культивирования. NK-клетки отделяли с помощью метода иммуномагнитной сепарации. К ДК и NK-клеткам вносили 20 мкг/мл rhHSP70 или gmHSP70. Антигенпредставляющую активность (АПА) ДК характеризовали по уровню стимуляции пролиферации аллогенных Т-лимфоцитов. Уровень продукции цитокинов IFN γ и TNF α оценивали в культуральной среде через 24 часа после добавления ДК к лимфоцитам с помощью ИФА. NK-клетки характеризовали по уровню продукции IFN γ (ELISPOT-тест), цитотоксической активности (ЦТА) в отношении клеточных мишеней: K562, линии меланомы человека MS (HLA⁺) и Kog (HLA⁻), а также по уровню продукции гранзима В с помощью проточной цитометрии.

Результаты исследования показали, что внесение препаратов rhHSP70 и gmHSP70 к ДК приводит к повышению АПА ДК по сравнению с необработанным контролем. Под влиянием этих препаратов наблюдалось усиление секреции IFN γ и TNF α лимфоцитами после их взаимодействия с ДК. Под влиянием gmHSP70 происходило возрастание количества IFN γ -секретирующих NK-клеток на 37,5%, тогда как rhHSP70 не влиял на их количество. Препарат gmHSP70 стимулировал ЦТА NK-клеток в отношении клеток линии K562 и обеих меланомных линий, а rhHSP70 повышал активность NK-клеток только в отношении клеток линии Kog. Внесение препаратов rhHSP70 и gmHSP70 к не фракционированным лимфоцитам (без предварительного отделения NK-клеток) приводило к увеличению количества гранзм В-положительных NK-клеток и содержания гранзима В в NK-клетках в 2 раза по сравнению с контролем. Обработка выделенной фракции NK-клеток препаратами rhHSP70 и gmHSP70 приводила к увеличению количества NK-клеток, секретирующих гранзим В, только в случае использования gmHSP70.

Выводы. Показано, что препарат gmHSP70 обладает высокой иммуностимулирующей способностью и повышает активность ДК и NK-клеток. Стимулирующий эффект rhHSP70 был выражен меньше и обнаружен в отношении АПА ДК, содержания цитокинов IFN γ и TNF α в культуральной среде после добавления к лимфоцитам зрелых ДК, предварительно обработанных rhHsp70, уровня ЦТА NK-клеток в отношении клеток меланомы HLA-линии Kog и уровня продукции гранзима В NK-клетками (в случае обработки суммарной популяции лимфоцитов). Препараты rhHSP70 и gmHSP70 обладают иммуномодулирующей активностью в отношении ДК и NK-клеток, что может быть использовано при создании вакцин на их основе.

ЦИТОКИНЫ В СЫВОРОТКЕ КРОВИ МЫШЕЙ, ИММУНИЗИРОВАННЫХ УБИТОЙ КУЛЬТУРОЙ СТРЕПТОКОККА ГРУППЫ А

Данилова Т.А., Горская Ю.Ф., Лунин В.Г.,
Грабко В.И., Шарапова Н.Е., Нестеренко В.Г.

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

Стрептококк группы А представляет собой один из наиболее распространенных микроорганизмов, вызывающих у человека целый спектр болезней, включая инвазивную инфекцию, а также так называемые постстрептококковые заболевания — ревматизм и гломерулонефрит. Эти процессы, как правило, сопровождаются повышением уровня цитокинов, ответственных за ряд

патологических проявлений в организме и тяжесть заболевания. В эксперименте высокий уровень провоспалительных цитокинов отмечен у мышей при стрептококковом артрите.

Целью исследований было изучение изменений уровня про- и противовоспалительных цитокинов при длительном введении мышам убитой вакцины стрептококка группы А. Мышей линии СВА иммунизировали убитой прогреванием вакциной стрептококка группы А 5-го типа внутрибрюшинно в течение 3-х недель. Ранее показано, что при такой схеме иммунизации у животных кроме антител к антигенам стрептококка наблюдается также образование аутоантител к различным тканям организма. Кровь брали на 8-й день после окончания иммунизации. Для определения цитокинов использовали набор для исследования цитокинов мышей Biorad (IL-2, IL-4, IL-5, IL-10, IL-12, TNF β IFN γ , GM-CSF), предназначенный для проведения мультиплексного флуоресцентного анализа на приборе Bio-Plex. Для определения аутоантител к антигенам миокарда использовали непрямой метод иммунофлуоресценции.

Показано, что содержание ряда цитокинов в сыворотке крови иммунизированных мышей значительно понижено по сравнению с сывороткой нормальных животных, причем это отмечено как для провоспалительных (IL-2, TNF β), так и для противовоспалительных цитокинов (IL-10, и IL-12). Количество γ -интерферона также существенно понижалось, уровень IL-4 и IL-5 в сыворотках иммунных и интактных мышей был примерно одинаковым. Следует отметить, что в сыворотках иммунизированных мышей обнаружены аутоантитела, перекрестно реагирующие с тканью миокарда, которые не выявлялись в сыворотках нормальных животных. Полученные данные свидетельствуют о различном влиянии антигенов стрептококка на разные звенья иммунной системы.

ВЗАИМОСВЯЗЬ ИММУННЫХ НАРУШЕНИЙ И СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНЫХ СВОЙСТВ ЭРИТРОЦИТОВ В УСЛОВИЯХ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО ГНОЙНОГО ХОЛАНГИТА

Долгарева С.А., Ярош А.Л., Жарко С.В., Сергеев О.С., Конопля А.И., Гаврилюк В.П.

Курский государственный медицинский университет, г. Курск, Россия

Введение. При стрессе и в условиях патологии развивается метаболическая иммуносупрессия, обусловленная нарушением структуры клеточных мембран и индукцией иммуносупрессирующих свойств у эритроцитов [Прокопенко Л.Г. и др., 2001]. При этом недостаточно изученным остается роль красных клеток крови в патогенезе заболеваний хирургического профиля, в частности, при гнойном холангите.

Цель и задачи. Целью исследования явилось установление взаимосвязи между иммунными нарушениями и изменениям структурно-функциональных свойств эритроцитов, имеющих место при экспериментальном гнойном холангите.

Материалы и методы. Гнойный обтурационный холангит моделировали на крысах Вистар по Ахаладзе Г.Г. (1994) в модификации [Костин С.В. с соавт., 2004].

Основные результаты. Установлено, что введение аллогенным здоровым донорам эритроцитов, полученных на 2-е сутки от крыс после воспроизведения гнойного

холангита, супрессировало формирование гуморального иммунного ответа (ГИО) и гиперчувствительности и замедленного типа (ГЗТ), индуцированных эритроцитами барана, снижало функционально-метаболическую активность нейтрофилов (ФМА) периферической крови. Еще большей ингибирующей активностью обладали эритроциты, полученные на 3-и и 5-е сутки после воспроизведения гнойного холангита. Эритроциты интактных крыс, обработанные сывороткой аллогенных доноров с экспериментальным гнойным холангитом на 3-и (и еще больше на 5-е) сутки после воспроизведения, при введении здоровым аллогенным донорам также приводили к развитию иммуносупрессии. Эритроциты интактных крыс, обработанные плазмой, обогащенной тромбоцитами аллогенных доноров с гнойным холангитом, полученной на 3-и (и еще более на 5-е) сутки после воспроизведения, при введении в организм здоровым животным вызывали снижение показателей ГИО, ГЗТ и ФМА нейтрофилов, что не наблюдается при обработке плазмой, дефицитной тромбоцитами. Появление иммуносупрессирующих свойств у эритроцитов коррелирует с изменениями белкового спектра в их мембране. Так, начиная со 2-х суток от моделирования в сыворотке крови выявлены повышение концентрации ацилгидроперекисей и малонового диальдегида, которое достигает максимальных значений к пятым суткам, и снижение активности каталазы. На 5-е сутки наблюдаются изменения количественной представительности белков в мембране, сохраняющиеся и на 7, 9 и 12 сутки: увеличение количества анионтранспортного белка (или белка полосы 3), β -спектрина и белка полосы 4,5 и уменьшение содержания глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы.

Заключение. Полученные в работе данные свидетельствуют о том, что в условиях экспериментальной хирургической патологии (гнойный холангит) нарушается целый ряд параметров структурно-функциональных свойств эритроцитарной мембраны, играющих важную роль в патогенезе иммунологических расстройств при данной нозологии. Данный факт можно объяснить тем, что в условиях наблюдаемого окислительного стресса происходят нарушения структуры клеточных мембран, накопление в сосудистом русле измененных продуктов метаболизма, которые, фиксируясь на «модифицированной» мембране эритроцитов, доставляются в лимфоидные органы и, взаимодействуя с иммунокомпетентными клетками, индуцируют выделение последними иммуносупрессорных соединений.

ИЗУЧЕНИЕ ПРОЦЕССА ФОРМИРОВАНИЯ НЕЙТРОФИЛЬНЫХ ВНЕКЛЕТОЧНЫХ ЛОВУШЕК ПОД ВОЗДЕЙСТВИЕМ ЛАЗЕРА НИЗКОЙ ИНТЕНСИВНОСТИ

Долгушин И.И., Гизингер О.А., Маркова В.А., Ишпахтина К.Г.

НИИ иммунологии ЧелГМА, г. Челябинск, Россия

Введение. Одной из важнейших функций нейтрофильного гранулоцита является антимикробная защита. В 2004 году Arturo Zychlinsky был открыт механизм уничтожения патогенов нейтрофилами, который заключается в способности активированных клеток «выбрасывать» сетеподобные структуры, состоящие из нуклеиновых кислот и ферментов, в которых задерживаются, нейтрализуются, а затем и погибают микроорганизмы.

Эти новые структуры получили название нейтрофильных внеклеточных ловушек (НВЛ). Низкоинтенсивное лазерное излучение (НИЛИ) непосредственно стимулирует функциональную активность нейтрофилов, влияя на процессы фагоцитоза. Однако исследования о влиянии физических факторов, в том числе лазерного излучения низкой интенсивности, на формирование НВЛ до настоящего времени не проводилось.

Целью исследования является изучение воздействия низкоинтенсивного лазерного излучения на процесс формирования НВЛ в крови человека.

Материалы и методы. Эксперимент *in vitro* был проведен на нейтрофилах, выделенных из периферической крови человека методом дифференциального центрифугирования на двойном градиенте плотности фиколл-верографин (плотность = 1,077 и 1,093 г/см). Выход нейтрофилов – 90-95%. Взвесь нейтрофилов в концентрации 5×10^6 /мл подвергалась воздействию низкоинтенсивного лазерного излучения с переменной генерацией импульса (длина волны – 632 нм, частота – 80 Гц, мощность – 50 Вт). Облучение нейтрофильных лейкоцитов проводилось в термостате при температуре 36,6 °С в течение 4 мин. Препарат наносился на предметное стекло, фиксировался этиловым спиртом и окрашивался раствором красителя акридинового оранжевого. Результат оценивался при помощи люминесцентной микроскопии. В качестве контроля выступала чистая фракция нейтрофилов в концентрации 5×10^6 /мл, окрашенная аналогичным способом.

Полученные результаты. При облучении нейтрофильных гранулоцитов НИЛИ с переменной генерацией импульса (длина волны – 632 нм, частота – 80 Гц, мощность – 50 Вт) в течение 4 мин формируется 22% НВЛ от общего числа НГ, в интактных нейтрофилах процент НВЛ составил 7%. При инкубации НГ в термостате 30 мин при температуре 36,6 °С с последующим их облучением НИЛИ в течение 4 мин приводит к образованию НВЛ в количестве 28%, во фракции нейтрофилов подвергшихся лишь температурной обработке (инкубация в термостате 30 мин при 36,6 °С) количество НВЛ составило 11%.

Выводы. Облучение нейтрофильных гранулоцитов НИЛИ в течение 4 мин приводит к увеличению количества нейтрофильных внеклеточных ловушек в 3 раза по сравнению с интактными нейтрофилами. При совместном действии НИЛИ и температуры происходит увеличение количества НВЛ в 2,5 раза по сравнению с нейтрофильными гранулоцитами, которые подвергались воздействию только температурного фактора.

ВЛИЯНИЕ АНОМАЛЬНОГО МАГНИТНОГО ПОЛЯ НА ИММУНОМОРФОЛОГИЧЕСКИЕ НАРУШЕНИЯ ПРИ ОСТРОЙ ТЕТРАХЛОРМЕТАНОВОЙ ТОКСИЧЕСКОЙ ГЕПАТОПАТИИ

Дудка В.Т., Литвинова Е.С., Польской В.С., Михайлова А.И., Польшина О.Н., Чуева Т.В.

Курский государственный медицинский университет,
г. Курск, Россия

Введение. В последние годы все большую актуальность приобретает патология, обусловленная воздействием на организм разнообразных агрессивных факторов внешней среды, а особенно при сочетанном их воздей-

ствии. Среди них одними из наиболее распространенных являются токсические агенты, в том числе и гепатотропные, а также воздействие магнитных полей различных по происхождению и параметрическим характеристикам. Известно, что переменные магнитные поля могут вызывать в организме человека те или иные функциональные и структурные нарушения. Влияние же слабых магнитных полей, соизмеримых по своим характеристикам с естественными аномальными геомагнитными воздействиями, изучено недостаточно. По мнению некоторых исследователей, длительное воздействие постоянных магнитных полей (ПМП) малой интенсивности может быть даже более активным по сравнению с действием магнитных полей высокой напряженности. Развивающиеся при этом в разных органах и тканях морфофункциональные изменения остаются мало изученными.

Цель исследования: изучение морфофункциональных иммунных нарушений при остром тетрахлорметановом токсическом поражении печени в условиях длительного воздействия постоянного магнитного поля.

Материалы и методы. В эксперименте на крысах линии Вистар воздействие ПМП, соизмеримого по своим характеристикам с естественным геомагнитным полем в зоне Курской магнитной аномалии, моделировали с помощью специально созданной установки, состоящей из высокостабилизированного источника постоянного тока и двух колец Гельмгольца. Острое токсическое поражение печени вызывали пятикратным с 24-часовым интервалом внутримышечным введением 50% масляного раствора четыреххлористого углерода (ЧХУ) в дозе 3 мл/кг веса. Экспериментальные животные были разделены на две группы: 1-я – животные с острым тетрахлорметановым токсическим поражением печени, 2-я – животные, подвергнутые острой интоксикации ЧХУ в условиях воздействия ПМП, в котором они после отравления продолжали находиться на протяжении 28 дней. Контролем являлись интактные крысы. На 1, 7, 14, 21 и 28-е сутки эксперимента у животных определяли активность, интенсивность и завершенность фагоцитоза, функциональную активность нейтрофилов по НСТ-тесту, уровень комплемента в сыворотке крови и формирование иммунной реактивности на эритроциты барана. Кусочки печени и селезенки фиксировали в 10% нейтральном формалине и жидкости Карнуа. Использована заливка тканей в парафин и в желатину; готовились нефиксированные свежемороженые срезы. Гистологические срезы окрашивали гематоксилином и эозином, метиловым зеленым пиронином по Браше, использовали окраски суданом IV и сульфатом нильским голубым. Нейтральные мукополисахариды выявляли PAS-реакцией по Мак-Манусу, гликоген – PAS-реакцией с дополнительной обработкой срезов амилазой. Цифровые данные обрабатывали статистически.

Основные результаты. Установлено, что у животных 1-й группы (с острым тетрахлорметановым токсическим поражением печени) показатели иммунологической реактивности и функционально-метаболической активности нейтрофилов периферической крови по сравнению с контролем были достоверно выше на протяжении первых 14 суток эксперимента. При этом морфологически в селезенке развивались выраженные гиперпластические изменения: увеличение удельной площади лимфоидных фолликулов, в своем большинстве они увеличены в размерах, с относительно крупными реактивными центрами, с широкой мантийной зоной, с высокой активностью реакции бласттрансформации. В течение последующих двух недель эксперимента наблюдалась постепенная

нормализация описанных изменений с полным восстановлением структурно-функциональных нарушений к 28 суткам. У животных 2-й группы (с острым токсическим поражением печени ЧХУ в условиях длительного воздействия ПМП) выявлено увеличение значений всех показателей иммунологической реактивности, функционально-метаболической активности нейтрофилов периферической крови и степени гиперпластических изменений в селезенке по сравнению с животными 1-й группы с достижением максимума к 14-21 суткам и сохранением их высокого уровня на протяжении всего эксперимента.

Заключение. Таким образом, в условиях длительного воздействия ПМП острое тетрахлорметановое токсическое поражение печени сопровождается развитием у экспериментальных животных более выраженных и длительно сохраняющихся морфофункциональных иммунных нарушений по сравнению с изолированной острой токсической гепатопатией.

ИЗУЧЕНИЕ ЦИТОКИНОПОДОБНЫХ ФАКТОРОВ ЦЕЛОМОЦИТОВ МОРСКОЙ ЗВЕЗДЫ *ASTERIAS RUBENS*

Дьячков И.С.¹, Симбирцев А.С.², Полевщиков А.В.¹

¹ НИИ экспериментальной медицины СЗО РАМН, Санкт-Петербург, Россия

² Гос. НИИ особо чистых биопрепаратов ФМБА РФ, Санкт-Петербург, Россия

Решение фундаментальных проблем иммунологии связано с изучением процесса становления иммунной системы, поиском молекулярных и клеточных основ реакций врожденного и приобретенного иммунитета позвоночных и сравнительно-иммунологическим анализом процесса эволюции функций иммунной системы. Традиционно в иммунологических исследованиях особое внимание уделяется изучению защитных реакций наиболее продвинутых форм животных, к которым в первую очередь относятся млекопитающие. Однако единственный путь, который позволяет выявить причины возникновения, изучить процесс становления отдельных элементов иммунной системы и понимания характера их взаимосвязи и перейти к пониманию всего явления иммунной защиты в целом, — это обращение к филогенетически более древним формам жизни.

Целью данной работы был анализ механизмов клеточных реакций врожденного иммунитета иглокожих; поиск примитивных медиаторных сигналов, необходимых для реализации реакций врожденного иммунитета иглокожих.

Материалом для исследования служили супернатанты культур целомоцитов морской звезды *Asterias rubens*, полученные по завершении митогенной стимуляции *in vitro* в течение разных сроков. Способность целомоцитов к продукции цитокиноподобных факторов оценивали с помощью метода твердофазного двухдетерминантного ИФА (ООО «Цитокин», Санкт-Петербург). ИФА проводили в соответствии с рекомендациями изготовителя. Для оценки влияния цитокинов человека на цитотоксические функции целомоцитов клетки инкубировали в присутствии рекомбинантных цитокинов человека IL-1 α , C3a, IFN γ (25 пг/мл, 10 пг/мл и 100 пг/мл соответственно). Эффект влияния иммуномедиаторов на цитотоксические свойства субпопуляций целомоцитов оценивали методом учета числа зон гемолиза в слое эритроцитов человека в условиях *in vitro* через 18 ч инкубации при температуре

$t \approx +5^\circ\text{C}$. Параллельно проводили измерение оптической плотности надосадочной жидкости методом спектрофотометрии при длине волны $\lambda = 405$ нм.

Установлено, что целомоциты животных, предстимулированных суспензией зимозана, продуцировали IL-1 β -подобный фактор на всех сроках инкубации лишь на фоне стимуляции митогеном Кон А. Наибольшая выявленная концентрация IL-1 β достигала $158,51 \pm 0,159$ пг/мл на сроке 48 ч инкубации. Изменения концентраций IL-1 β -подобной молекулы в надосадках целомоцитов на фоне стимуляции клеток ФГА носили слабо выраженный волнообразный характер. Выявленные уровни продукции подобных TNF α факторов гораздо ниже по сравнению с уровнями IL-1 β -подобного фактора и не превышают 50 пг/мл. Тем не менее стимуляция целомоцитов *A. rubens* Кон А и лимфоцитарным митогеном обеспечивает более высокие уровни TNF α -подобных факторов по сравнению с ФГА. Важной представляется находка молекулы, обладающей перекрестной реактивностью с IFN γ человека. Ответом на предстимуляцию животных *in vivo* суспензией зимозана является продукция фактора, обладающего перекрестной реактивностью с IFN γ на сроках 12-72 ч культивирования *in vitro*. При анализе данных установлено, что предстимуляция растворимым ЛПС и корпускулярным зимозаном по-разному влияет на продукцию цитокиноподобных факторов. Зимозан вызывает немедленное повышение продукции цитокиноподобных факторов, что особенно заметно на примере факторов, имеющих антигенное сходство с IFN γ и в меньшей степени с TNF α , то ЛПС имеет отсроченный эффект, развивающийся в отсутствие митогенов через 48-96 ч. Что касается IL-1 β -подобной активности, то ее продукция носит у *A. rubens* конститутивный характер.

Рекомбинантный IL-1 α человека вызывает достоверный прирост цитотоксической активности всех фракций целомоцитов морских звезд в отношении эритроцитов человека. Во фракции агранулярных целомоцитов под влиянием IL-1 α в концентрации 25 пг/мл число зон гемолиза возрастает на 65%, в то время как C3a (10 пг/мл) и IFN γ (100 пг/мл) не вызывают такого эффекта. Лимфоцитоподобные клетки также отвечали на рекомбинантный IL-1 α повышением числа зон гемолиза. В случае этой фракции прирост составил 28%. Для фракции, представленной гранулярными целомоцитами, показано, что только C3a достоверно повышает число зон гемолиза в слое ЭЧ на 56%. Работа поддержана грантом РФФИ № 07-04-00084.

ИНТЕРФЕРОНЫ ПЕРВОГО ТИПА (IFN-I) И ФАКТОР, СТИМУЛИРУЮЩИЙ ОБРАЗОВАНИЕ КОЛОНИЙ ГРАНУЛОЦИТОВ (G-CSF), — МЕДИАТОРЫ ПОВЫШЕННОЙ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ К ТУБЕРКУЛЕЗУ У МЫШЕЙ

Еремеев В.В., Dorhoi A., Bandermann S., Hanke K., Mollenkopf H.-J., Kursar M., Kaufmann S.H.E.

ГУ ЦНИИ туберкулеза РАМН, Москва, Россия
Институт инфекционной биологии Макса Планка,
г. Берлин, ФРГ

Введение. Данные о роли IFN-I при туберкулезе противоречивы. Манса и соавторы (2001) продемонстрировали отрицательное влияние введения IFN-I на течение туберкулеза у мышей. Напротив, Kuchteu и соавторы (2006) отмечают несколько лучший контроль БЦЖ на ранних

стадиях инфекции у мышей, лишенных гена рецептора к IFN-I (IFN $\alpha\beta$ R). Наконец, Turner и Orme (2004) не зарегистрировали влияния IFN-I на туберкулез у мышей. В связи с этим целью исследования стало изучение роли сигнала, передаваемого через IFN $\alpha\beta$ R, в регуляции чувствительности к туберкулезу.

Материалы и методы. Исследование проведено на мышах линии 129S2 и нокаутах (KO) по гену IFN $\alpha\beta$ R на их основе. Для низкодозового (100-200 КОЕ/мышь) аэрозольного заражения использовали лабораторный штамм *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv (Mtb). Клеточный состав легких оценивали методом цитофлуориметрии. Содержание хемокинов и цитокинов в сыворотке крови и легочном гомогенате определяли на приборе Bio-Plex Cytokine Assay, Bio-Rad. Выделенную из легочных макрофагов РНК анализировали в микроаррее на основе Agilent Technologies и ПЦР в реальном времени. Для высева на селективную среду гистологической и иммуофлуоресцентной окраски использовали образцы тканей легкого, полученные от животных на 21-й день после заражения.

Основные результаты. Установлено, что в отличие от высокочувствительной к туберкулезу родительской линии 129S2 (гибель через 4-5 недель после заражения) IFN $\alpha\beta$ R KO высоко резистентны к заболеванию (выживаемость свыше 100 дней). Параллельно с этим бактериальная нагрузка в легких мышей дикого типа на 1 порядок превышает таковую у KO. Визуально легкие мышей 129S2 характеризуются массивной инфильтрацией клетками гранулоцитарно-макрофагального ряда, наличием зон жидкого некроза и нарушением нормального гранулемообразования. Отсутствие IFN $\alpha\beta$ R ведет к значительному снижению проявлений легочной патологии. Гипертрофированная воспалительная реакция мышей 129S2 по сравнению с IFN $\alpha\beta$ R KO подтверждается существенным повышением содержания таких факторов, как IL-1 α и IL-1 β , IL-6, G-CSF, KC и MCP-1, в гомогенате легкого. В сыворотке крови мышей дикого типа повышено содержание G-CSF. Соответственно этому содержание нейтрофилов в крови и тканях легкого существенно повышено у мышей дикого типа по сравнению с IFN $\alpha\beta$ R KO. Удаление нейтрофилов либо G-CSF на 10-14-й день после заражения ведет к существенному увеличению сроков жизни зараженных мышей 129S2. Сравнительный анализ РНК, полученной из легочных макрофагов через 24 ч после заражения *Mtb in vitro*, продемонстрировал специфическое для макрофагов дикого типа усиление экспрессии генов KC, RANTES и CCR7. А в отсутствие IFN $\alpha\beta$ R – интерферон-индуцируемых GTPаз – Iigp1 и Iigp2, существенных для киллинга микобактерий макрофагами [MacMicking, 2005], а также ингибцию экспрессии генов факторов, участвующих в хемотаксисе гранулоцитов, Ccl24, Sxc17 и Sxc14.

Заключение. Делеция гена IFN $\alpha\beta$ R повышает резистентность чувствительных к туберкулезу мышей 129S2. Резистентный статус нокаута характеризуется снижением уровня провоспалительных цитокинов-хемокинов в легких, а также уменьшением гранулоцитарно-макрофагальной инфильтрации и постапоптотического некроза инфильтрирующих клеток. Удаление нейтрофилов защищает мышей от летальной инфекции. Таким образом, провоспалительный эффект IFN-I может оказать патогенное воздействие при туберкулезе, и его применение в терапевтических схемах лечения людей требует крайней осторожности.

ИЗУЧЕНИЕ СОВМЕСТНЫХ ЭФФЕКТОВ ХОРИОНИЧЕСКОГО ГОНАДОТРОПИНА И РЕКОМБИНАНТНОГО IL-2 НА ФУНКЦИОНАЛЬНУЮ АКТИВНОСТЬ МОНОЦИТОВ

Заморина С.А., Ширшев С.В.

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

Оплодотворенная яйцеклетка уже на уровне бластоцисты начинает продуцировать хорионический гонадотропин (ХГ), который модулирует не только процессы стероидогенеза, но и иммунные реакции матери, поддерживая жизнеспособность полуаллогенной бластоцисты. В этот период главную роль играют моноциты/макрофаги, которые кумулируются в децидуальной оболочке и принимают участие в имплантации и плацентации, а также осуществляют клиренсную функцию. Известно, что в период беременности синцитиотрофобласт, экспрессирующий ген IL-2, секретирует данный цитокин в маточно-плацентарный компартмент. Таким образом, в гемохориальной области клетки одновременно контактируют с ХГ и IL-2, направленность эффектов которых прямо противоположна. Целью работы была оценка совместного влияния ХГ и IL-2 на фагоцитарную активность моноцитов женщин.

Материалы и методы. В работе использовали сепарированные моноциты периферической крови небеременных женщин, полученные в фолликулярную фазу менструального цикла. Моноциты выделяли из суспензии мононуклеаров, полученных центрифугированием в градиенте плотности фиколл-верографина, методом двойного пассажа на чашках Петри. Чистота моноцитов составляла 78-95% (CD14⁺), жизнеспособность – 95-98%. ХГ («Profasi», Италия) использовали в концентрациях 10 и 100 МЕ/мл, отражающих его уровни в крови в I и III триместрах беременности соответственно. Рекомбинантный IL-2 (г. Львов, Украина) применяли в дозе 100 МЕ/мл. Полученные клетки инкубировали с ХГ и IL-2 в течение часа при 37 °С. Фагоцитарную активность моноцитов определяли по степени снижения свечения люминесцентного генно-инженерного штамма бактерий *E. coli lux⁺*, которые являлись объектом фагоцитоза. Окислительную активность моноцитов оценивали в реакции ЛЗХЛ как в спонтанном, так и стимулированном бактериями *E. coli K12* варианте. В супернатантах оценивали уровень миелопероксидазы (МПО) спектрофотометрическим методом и уровень NO микрометодом при помощи реактива Грисса. Экспрессию CD25 на моноцитах определяли методом проточной цитофлуориметрии после 16-часовой инкубации с ХГ.

Результаты и обсуждение. Показано, что ХГ (10 и 100 МЕ/мл) снижает фагоцитарную активность моноцитов женщин и уровень МПО, но не влияет на уровень NO и стимулированную продукцию активных форм кислорода (АФК), фиксируемую в реакции ЛЗХЛ. Помимо этого, изучено влияние ХГ на экспрессию моноцитами CD25 – рецептора для IL-2. Показано, что моноциты периферической крови женщин экспрессируют этот маркер в довольно низкой концентрации (0,33-2,54% CD14⁺ клеток), однако не выявлено достоверных эффектов ХГ на уровень экспрессии CD25.

Изучая совместные эффекты ХГ и IL-2 на функциональную активность моноцитов женщин, показано, что присутствие IL-2 способно модулировать эффекты

ХГ в отношении фагоцитарной и окислительной активности клеток, а также продукции ими NO. Так, IL-2 способствует частичной отмене депрессивного эффекта ХГ на показатели фагоцитоза и реализации стимулирующего эффекта ХГ 100 МЕ/мл на продукцию моноцитами NO. Кроме того, в присутствии IL-2 гормон реализует депрессивные эффекты на стимулированную продукцию АФК, фиксируемую в реакции ЛЗХЛ. В то же время присутствие IL-2 не влияло на эффекты гормона в отношении секреции моноцитами МПО и продукции АФК в спонтанном варианте ЛЗХЛ. Таким образом, IL-2 служит важным фактором, модулирующим эффекты ХГ в отношении моноцитов.

Работа поддержана Фондом содействия отечественной науке.

ОЦЕНКА ДЕЙСТВИЯ «РОНКОЛЕЙКИНА» ПРИ РАЗЛИЧНЫХ СПОСОБАХ ВВЕДЕНИЯ НА ОПУХОЛЕВЫЙ РОСТ В ЭКСПЕРИМЕНТЕ

Златник Е.Ю., Евстратова О.Ф., Никипелова Е.А., Болдырева Н.Г.

ФГУ «РНИОИ Росмедтехнологий», г. Ростов-на-Дону, Россия

ООО «Биотех», Санкт-Петербург, Россия

Введение. «Ронколейкин» – препарат рекомбинантного IL-2, среди биологических эффектов которого отмечен антипролиферативный, благодаря чему препарат нашел применение в комплексном лечении некоторых опухолей. Типичным способом введения является внутривенное капельное, однако с учетом того, что показано его прямое повреждающее действие на некоторые опухолевые клетки, представляется актуальным изучение его эффекта при непосредственном введении в опухоль.

Цель. Целью работы явилось изучение действия различных способов введения «Ронколейкина» на динамику опухолевого роста в эксперименте.

Материалы и методы. 20 белым беспородным крысам перевивали под кожу спины саркому С45 и по достижении опухоли размера 2,0-2,5 см³ начинали введение «Ронколейкина» (по 9000 МЕ 1 раз в 2-4 дня, на курс 9 инъекций, т.е. 405,000 МЕ/кг). Крысам 1-й группы «Ронколейкин» вводили внутримышечно (в/м), 2-й – в опухоль (в/о), 3-й – по половине дозы в/м и в/о. 4-я группа была контрольной и получала физиологический раствор в/м. Ежедневно определяли объем опухоли. Через 4 недели животных забивали; опухоли, тимусы и селезенки фиксировали по Карнуа, срезы окрашивали их по Браше, после чего выполняли гистологическое исследование. В каждой группе было по 5 животных.

Результаты. Сравнительная характеристика динамики роста перевиваемой опухоли у крыс различных групп показала, что у животных контрольной группы увеличение объема С45 продолжалось на протяжении 4-х недель и достигло 14,8±2,52 см³. Внутримышечное введение «Ронколейкина» не вызвало изменений динамики роста опухоли по сравнению с контрольной группой. Введение препарата в опухолевую ткань привело к менее интенсивному росту опухоли, чем в описанных группах, причем у одного животного произошла полная регрессия. Наилучший результат наблюдался в 3-й группе крыс, получавшей ронколейкин в/м+в/о: у одного из животных отмечена полная регрессия, у остальных – торможение С45. Через 4 недели объем С45 у них составил 1,35±0,56 см³.

Результаты гистологического исследования опухоли показали, что в контроле отмечалось густое расположение опухолевых клеток, встречались клетки с фигурами митозами, в том числе атипичными; лимфоцитарный валик вокруг опухоли отсутствовал, инфильтрация опухоли макрофагами, лимфоцитами, плазматическими клетками была незначительной. Введение препарата в опухоль приводило к формированию в ней зон дистрофии и некроза. Наиболее выраженные изменения наблюдались в опухолях крыс 3-й группы: регрессия опухоли, вплоть до полной, с замещением опухолевой ткани рубцовой соединительной тканью, по краю отмечалась мощная макрофагальная, плазмочитарная и лимфоцитарная инфильтрация с образованием валика. Скопление иммунокомпетентных клеток в очаге и вокруг него предполагает ограничение дальнейшего роста опухоли, а их разнообразие позволяет судить об интенсивных межклеточных взаимодействиях в ходе иммунного ответа на опухолевые антигены. Возможная продукция собственных цитокинов при этих взаимодействиях может вносить вклад в реализацию противоопухолевого эффекта. Внутримышечное введение «Ронколейкина» вызывало менее демонстративные изменения. У крыс 3-й группы отмечалось увеличение размера долек тимуса и плотности тимоцитов в них, а также увеличение числа и размеров фолликулов селезенки, их герминативных центров (В-зон) и расширение периартериальных лимфатических муфт (Т-зон). У животных 1-й и 2-й групп эти изменения были выражены слабее, а у контрольных – отсутствовали.

Заключение. Таким образом, как показано на примере перевиваемой саркомы, «Ронколейкин» может проявлять не только опосредованное через стимуляцию различных клеток иммунной системы, но и прямое повреждающее действие на опухоль. Комбинация локального и системного введения препарата, по-видимому, является оптимальной.

ВЛИЯНИЕ ПЕПТИДА АКТИВНОГО ЦЕНТРА ГМ-КСФ НА РЕАКЦИЮ БЛАСТТРАНСФОРМАЦИИ ЛИМФОЦИТОВ

Зурочка В.А., Зурочка А.В., Суховой Ю.Г.¹, Костоломова Е.Г.¹, Зуева Е.Б.

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

¹ Тюменский филиал ГУ НИИ клинической иммунологии СО РАМН, г. Тюмень, Россия

Ранее нами было показано, что синтетические пептиды из активного центра ГМ-КСФ обладают выраженной стимулирующей активностью на колоние- и кластерообразование костномозговых клеток предшественников гранулоцито-монопоэза (патент № 2061699 (1994), патент № 213608 (1994)).

В то же время многие механизмы действия данных пептидов на клетки иммунной системы остаются неизученными. Учитывая, что данные пептидные вещества способны стимулировать костномозговое кроветворение, важно было выявить, вызывают ли данные пептидные продукты бластную трансформацию лимфоцитов (РБТЛ). С этой целью было изучено влияние двух пептидов (16 и 12 аминокислот соответственно) в концентрациях от 10⁻¹ до 10⁻⁵ мг/мл. В качестве контроля был использован ФГА («Дифко», США) в стандартной концентрации. РБТЛ изучали методом проточной цитометрии.

Исследования показали, что оба пептида обладают способностью вызывать бластную трансформацию лимфоцитов *in vitro*. При этом надо отметить, что пептид, состоящий из 16 аминокислот, обладал значительно более высокой активностью как по сравнению с пептидом состоящим из 12 аминокислот, так и по сравнению со стандартным митогеном ФГА. Максимальная активность пептида находилась в диапазоне концентрации 10^{-3} - 10^{-4} мг/мл.

Таким образом, синтетические пептиды активного центра ГМ-КСФ обладают не только способностью стимулировать костномозговое кроветворение, но и вызывают бластную трансформацию лимфоцитов. Последнее свидетельствует о возможном их влиянии не только на процессы дифференцировки клеток – предшественников грануло-моноцитопоэза, но и на их пролиферацию. Одновременно полученные данные свидетельствуют о возможном участии ГМ-КСФ и в процессах пролиферации, а возможно, и дифференцировки лимфоцитов.

ИММУНОРЕГУЛИРУЮЩАЯ АКТИВНОСТЬ ХИТОЗАНА И ЕГО ПРОИЗВОДНЫХ

Иванушко Л.А., Соловьева Т.Ф., Запорожец Т.С.

ГУ НИИ эпидемиологии и микробиологии СО РАМН, г. Владивосток, Россия
Тихоокеанский институт биоорганической химии ДВО РАН, г. Владивосток, Россия

Актуальность. Хитозан – поликатионный линейный полисахарид, полимерная цепь которого состоит из β -1,4-связанных остатков D-глюкозамина и N-ацетил-D-глюкозамина, широко используется в медицинских целях и в ветеринарии. Возросший интерес к хитину и хитозану объясняется выраженной биологической активностью (противомикробной, противоопухолевой, противовоспалительной, иммуномодулирующей и др.). Однако некоторые физико-химические свойства хитозана, такие как нерастворимость и высокая вязкость в нейтральных и щелочных водных растворах, плохая всасываемость из желудочно-кишечного тракта, ограничивают его применение в медицине, что диктует необходимость поиска производных хитозана, лишенных этих недостатков. Наиболее перспективными являются хорошо растворимые хитозаны низкой молекулярной массы и хитоолигосахариды, получаемые химической или ферментативной деградацией исходного продукта.

Целью настоящей работы явилось сравнительное изучение иммуномодулирующей активности хитозана и его производных, обладающих улучшенными физико-химическими свойствами.

Материалы и методы. В работе использовали хитозан и его производные: исходный высокомолекулярный хитозан (Х-ВМ), низкомолекулярный хитозан (Х-НМ), N-ацил-хитобиоза (I), N-ацил-хитотриоза (II), N-ацил-хитотетраоза (III), N-ацилированный низкомолекулярный хитозан (IV), карбоксиметилхитозан (KM), карбоксиэтилхитозан (КЭ), карбоксипропилхитозан (КП).

Результаты. Установлено, что свойства хитозана низкой молекулярной массы, ацилированного низкомолекулярного хитозана и хитоолигосахаридов, а также карбоксипропилхитозана сравнимы с иммуномодулирующими свойствами высокомолекулярных хитозанов. Производные хитозана сохраняют адьювантную активность, спо-

собность к стимуляции функциональной активности нейтрофилов, оказывают влияние на продукцию цитокинов, вырабатываемых преимущественно Th-1 (IFN γ), Th-2 (IL-10) и мононуклеарными фагоцитами (TNF α , IL-1 α) в культуре клеток цельной крови. Цитокинмодулирующее действие производных хитозана зависит от исходного уровня тестируемого цитокина, а в случае IL-10 и от структуры хитозана. X-ВМ и X-НМ усиливают экспрессию активационных антигенов (CD25, CD69 и CD95) на лимфоцитах периферической крови здоровых доноров в системе *in vitro*. Ацилхитозан (производное IV) и карбоксипропилхитозан (КП-Х) не оказывают влияния на уровень экспрессии активационных маркеров как на всех лимфоцитах периферической крови, так и на Т-лимфоцитах. Хитозан низкой молекулярной массы и ацилированный низкомолекулярный хитозан повышают выживаемость мышей при эндотоксиновом шоке, индуцированном бактериальным ЛПС. Высокомолекулярный хитозан, низкомолекулярный хитозан и ацилированный низкомолекулярный хитозан оказывают выраженный бактериостатический эффект по отношению к *Staphylococcus aureus* и *Yersinia pseudotuberculosis*.

Заключение. Таким образом, исследованные образцы производных хитозана, имеющие улучшенные физико-химические свойства по сравнению с исходным высокомолекулярным хитозаном, обладают широким спектром биологической активности и являются перспективными веществами для создания лекарственных препаратов и биологически активных добавок к пище.

ИЗУЧЕНИЕ ВЛИЯНИЯ РАЗЛИЧНЫХ ИММУНОМОДУЛЯТОРОВ И АДЬЮВАНТОВ НА ПРОТЕКТИВНЫЕ СВОЙСТВА АТОКСИЧНОЙ РЕКОМБИНАНТНОЙ ФОРМЫ ЭКЗОТОКСИНА A PSEUDOMONAS AERUGINOSA

Исаков М.А., Калошин А.А., Кривцов Г.Г., Михайлова Н.А., Зверев В.В.

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

Введение. В настоящее время отсутствуют специфические иммунобиологические препараты для лечения инфекций, вызываемых *Pseudomonas aeruginosa*. Известно, что инактивированная форма экзотоксина А, основного фактора патогенности микроорганизма, обладает иммуногенной активностью и поэтому может быть использована для получения специфического иммунного препарата. Однако условия традиционного производства не обеспечивают стандартность и безопасность для персонала этапа культивирования производственных штаммов. Это обуславливает целесообразность поиска новых решений при создании вакцины против синегнойной палочки. Используя методы генной инженерии, нами получена рекомбинантная форма экзотоксина А – аTox I-II- Δ III, несущая делецию в домене III, ответственном за токсичность.

Цели и задачи. Целью данной работы являлось изучение влияния различных иммуномодуляторов и адьювантов на протективные свойства препарата аTox I-II- Δ III.

Материалы и методы. В работе использован очищенный рекомбинантный белок аTox I-II- Δ III, а также три варианта адьювантов – иммуностимуляторов. Первая группа беспородных мышей получала белок аTox I-II- Δ III без адьюванта, вторая – аTox I-II- Δ III, сорбированный

на $Al(OH)_3$ в соотношении 1:3 в течение 24 часов. Животные третьей группы дополнительно с сорбированным белком в качестве иммуностимулятора получали очищенную ДНК *E. coli* в дозе 25 мкг на мышь. В четвертой группе мышей иммунизировали белком аТох I-II-ΔIII с добавлением хитозана, проявляющего как адьювантные, так и иммуностимулирующие свойства, до конечной концентрации 0,5%. Животных контрольной группы не иммунизировали. Препараты в объеме 0,5 мл вводили двукратно с двухнедельными интервалами в дозе по белку 25 мкг на мышь. По истечении двух недель после последней иммунизации мышам вводили очищенный полноразмерный рекомбинантный экзотоксин А, отмечали гибель животных в течение 5 дней и рассчитывали LD_{50} .

Результаты. В контрольной группе LD_{50} соответствовала 2,7 мкг на мышь. Для группы мышей иммунизированных препаратом аТох I-II-ΔIII без адьюванта LD_{50} составила 5 мкг экзотоксина А, с добавлением $Al(OH)_3$ – 20 мкг, в третьей группе – 45,1 мкг, а с использованием хитозана 15,6 мкг индексы эффективности составили 2, 8, 18 и 6,2 соответственно. Полученные результаты показали, что препарат аТох I-II-ΔIII обладает слабыми иммуногенными свойствами. За счет использования $Al(OH)_3$ как адьюванта иммуногенность препарата выросла в 4 раза, а в сочетании с ДНК *E. coli* протективный эффект усилился в 9 раз. Применение хитозана для повышения иммуногенности препарата аТох I-II-ΔIII оказалось неэффективным по сравнению с $Al(OH)_3$.

Заключение. Применение различных иммуномодуляторов и адьювантов позволило значительно повысить иммуногенные свойства атоксичной рекомбинантной формы экзотоксина *A Pseudomonas aeruginosa*.

TAG7-HSP70-КОМПЛЕКС ВЫЗЫВАЕТ ДВА НЕЗАВИСИМЫХ ПУТИ КЛЕТОЧНОЙ ГИБЕЛИ: АКТИВАЦИЮ КАСПАЗ И ОКСИДАТИВНЫЙ СТРЕСС

Кабанова О.Д.¹, Лукьянова Т.И.¹, Духанина Е.А.², Яшин Д.В.¹, Сащенко Л.П.¹

¹ Учреждение Российской академии наук Институт биологии гена РАН, Москва, Россия

² Учреждение Российской академии наук Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгарда РАН, Москва, Россия

Исследуемый в нашей лаборатории белок Tag7 (PGRP-Speritidoglican recognition protein) проявляет антимикробную активность и участвует во врожденном иммунитете. Нами показано – комплекс Tag7-Hsp70, секретируемый лимфоцитами периферической крови человека, обладает цитотоксической активностью против раковых клеток и вызывает в них апоптоз.

Цель настоящей работы заключается в характеристике путей гибели опухолевых клеток, взаимодействующих с Tag7-Hsp70-комплексом.

Материалы и методы. Мышиные фибробласты L929, окрашенные следующими флуоресцентными красителями: акридиновым оранжевым, родамином 123 (R123), дегидрорадамином 123 (DHR123), $DiOC_6(3)$, анализировали на спектрофлуориметре (Shimadzu RF-1501). Использовали ингибиторы каспаз YVAD-CHO (широкого действия), DEVD-CHO (каспаза 3), IETD-CHO (каспаза 8); ингибитор лизосом-хлороквин; ингибитор катепсина В – Ca-074 Me; антиоксидант ионил.

Результаты. Tag7-Hsp70-комплекс вызывает в клетках L929 цитотоксические процессы, протекающие с различной скоростью. Первый максимум был зарегистрирован через 3 часа инкубации, второй – через 20 часов. Дискретность цитотоксичности и резко различающаяся скорость цитолиза могут быть связаны с индукцией различных механизмов передачи цитотоксического сигнала в различных клетках. Оба максимума цитотоксичности достигались при одной и той же концентрации комплекса, однако погибало разное число клеток. По-видимому, в клеточной культуре присутствуют клетки с разными рецепторами, взаимодействующими с Tag7-Hsp70-комплексом, и индуцируются цитотоксические сигналы, протекающие с разной скоростью. Нами получены клоны клеточной линии L929, погибающие под действием исследуемого комплекса либо через 3 часа, либо через 20 часов. Используя ингибиторы каспаз 1, 3, 8, было показано, что Tag7-Hsp70-комплекс после взаимодействия с клетками запускает каспазозависимую смерть через 3 часа. Медленно развивающиеся цитотоксические процессы были каспазозависимыми, цитотоксическая активность таких клеток не блокировалась ингибиторами каспаз 1, 3, 8, 9. Об участии лизосом в гибели клеток L929 под действием комплекса судили по росту флуоресценции акридинового оранжевого. Лизосомы влияли на цитотоксичность длительных процессов. Об этом свидетельствовала блокирующая хлороквином и ингибитором катепсина В цитотоксическая активность комплекса Tag7-Hsp70 на клетках. В присутствии ингибитора лизосом NH_4Cl наблюдалось заметное снижение флуоресценции $DiOC_6(3)$ и DHR123, что свидетельствует о совместном участии лизосомы и митохондрии в передаче цитотоксического сигнала. Преинкубация клеток с антиоксидантом ионилом приводила к полному исчезновению цитотоксического эффекта. Эти результаты могут быть объяснены нарушением проницаемости мембраны митохондрий и накопление на ней кислородных радикалов. Клетки в этом случае погибают в результате оксидативного стресса. К действию комплекса Tag7-Hsp70 чувствительны не только фибробластами мыши L929, но и клетки Т-лимфомы Yurkatt, метастазирующая линия аденокарциномы CSML-0, линия миеломы N80/I и линия меланомы M3. Значительное количество клеток погибало через 20 часов после взаимодействия с комплексом. Обнаружение процессов гибели клеток *in vitro* позволило нам исследовать противоопухолевое действие этого комплекса *in vivo*. Для этих целей была выбрана линия мышшиной меланомы M3. Введение комплекса Tag7-Hsp70 на 6-й день после введения опухолевых клеток оказывало задержку роста опухоли, повышало выживаемость животных.

Полученные результаты позволяют сделать следующие выводы: 1) секретируемый лимфоцитами комплекс Tag7-Hsp70 вызывает два различных механизма клеточной гибели в раковых клетках; 2) действует на различные линии опухолевых клеток; 3) обладает противоопухолевым действием *in vivo*. Мы показали, что в популяции клеток мышшиных фибробластов L929 существует несколько субпопуляций: одни погибают по классическому пути апоптоза в результате активации «каскада каспаз», другие – по каспазозависимому механизму – в результате оксидативного стресса при участии лизосом и митохондрий. Анализ обнаруженных путей проведения сигнала клеточной гибели приобретает особую важность

для развития новых стратегий опухолеспецифической иммунотерапии.

ВОЗРАСТНЫЕ ОСОБЕННОСТИ ВЛИЯНИЯ ТРАНСПЛАНТАЦИИ КЛЕТОК КОСТНОГО МОЗГА И ФЕТАЛЬНОЙ ПЕЧЕНИ НА СУБПОПУЛЯЦИОННЫЙ СОСТАВ КЛЕТОК ТИМУСА У МЫШЕЙ

Кирик В.М., Новикова С.Н.

Государственное учреждение «Институт генетической и регенеративной медицины АМН Украины», г. Киев, Украина

Введение. При использовании гемопоэтических стволовых клеток с целью коррекции возрастных или обусловленных заболеваниями нарушений иммунитета необходимо учитывать механизмы их расселения, дифференцировки и функционирования в организме реципиента. В связи с этим изучение изменений субпопуляций клеток тимуса как центрального органа иммунной системы, играющего важную роль и в процессах старения, является одним из возможных критериев оценки эффективности лечебных воздействий. Трансплантация гемопоэтических стволовых клеток животным разного возраста может позволить оценить изменения субпопуляционного состава клеток тимуса, вызванные взаимодействием между донорскими и собственными клетками разного происхождения и возраста.

Цель и задачи: сравнить эффекты трансплантации клеток костного мозга и фетальной печени на процессы дифференцировки тимоцитов у мышей разного возраста.

Материалы и методы. Эксперименты проведены на мышцах линии СВА/Са в возрасте 3 и 20 мес. Клетки костного мозга получали из бедренных костей 3-месячных доноров, клетки фетальной печени — из плодов 13,5 дня гестации. Фракцию мононуклеарных клеток выделяли на градиенте плотности Ficoll-Paque и трансплантировали в хвостовую вену. Через 4 недели определяли субпопуляции тимоцитов по маркерам CD3, CD4, CD8 методом лазерной проточной цитометрии на цитофлюориметр-сортере BD FACSAria.

Основные результаты. При фенотипировании клеток тимуса было обнаружено перераспределение их субпопуляций в сторону увеличения числа ранних недифференцированных TN (triple negative) и DN (double negative) тимоцитов вместе с дифференцированными SP (single positive) клетками, при относительном снижении числа промежуточных малодифференцированных DP (double positive) тимоцитов. Также отмечен рост числа CD3⁺ тимоцитов, что указывает на усиление продукции зрелых Т-лимфоцитов.

Обнаружены особенности в соотношении CD4⁺/CD8⁺ клеток. У старых интактных животных достоверно снижались индекс CD4⁺/CD8⁺ за счет роста SP CD8⁺. У молодых животных тенденция была противоположной: преобладал прирост SP CD4⁺. Это может свидетельствовать о том, что в молодом организме, в отличие от старого, трансплантация клеток костного мозга или фетальной печени вызывает более активную стимуляцию продукции в тимусе CD4⁺ клеток с регуляторными свойствами.

При сравнении показателей, в зависимости от источника трансплантата, установлено, что у молодых реципиентов достоверно больший рост SP CD8⁺ отмечается

при введении клеток фетальной печени, а у старых реципиентов — при введении клеток костного мозга.

Заключение. Обнаруженные изменения субпопуляционного состава клеток тимуса после трансплантации клеток костного мозга и фетальной печени связаны с усилением процессов их миграции и дифференцировки. Полученные данные свидетельствуют о существенных возрастных отличиях влияния гемопоэтических клеток разной степени зрелости на субпопуляционный состав клеток тимуса.

ИММУНОКОРРЕКЦИЯ ПОСТСТРЕССОРНОЙ МИОКАРДИОДИСТРОФИИ

Киселев Н.С., Крохина Н.Б., Базарный В.В.

ГОУ ВПО Уральская государственная медицинская академия Росздрава, г. Екатеринбург, Россия

Иммуномодуляторы сегодня находят применение в различных разделах медицины. В том числе это иллюстрирует и расширение сферы использования гранулоцитарного колониестимулирующего фактора (Г-КСФ). Он известен как стимулятор лейкопоэза, средство для мобилизации кроветворных клеток-предшественников. Кроме того, установлено его влияние на ремоделирование миокарда, неоангиогенез. Однако результаты клинической эффективности Г-КСФ в лечении заболеваний сердца противоречивы.

Цель данной работы заключалась в исследовании влияния Г-КСФ на состояние миокарда при постстрессорной миокардиодистрофии.

Материалы и методы. Исследование проведено на 50 беспородных крысах-самцах. Травматический стресс у экспериментальных животных моделировали путем перелома обеих бедренных костей. 24 крысам исследуемой группы после травмы ежедневно в течение трех суток вводили внутривенно препарат Г-КСФ (нейпоген, «Ф. Хоффманн — Ля Рош Лтд.», Швейцария) в дозе 1,68 МЕ. 26 крысам контрольной группы в эти же сроки внутривенно вводили по 0,2 мл стерильного физиологического раствора. На 3-е и 10-е сутки после травмы у животных оценивали гематологические показатели. На 10-е сутки после травмы проводили морфологическое исследование миокарда и определяли уровень острофазовых белков (СРБ, фибриноген, церулоплазмин).

Основные результаты. В посттравматическом периоде у контрольных животных отмечалась типичная картина крови. Под влиянием Г-КСФ выявлена выраженная активация гранулоцитопоэза. Уровень острофазовых белков (СРБ, фибриноген, церулоплазмин) существенно не отличались у животных обеих групп.

У крыс контрольной группы в стенке сердца наблюдались умеренно выраженные структурные нарушения реактивного характера. В эндокарде — отек, сегментарная деструкция эндотелия, лимфоплазмацитарная инфильтрация с примесью тучных клеток, в миокарде — расстройство кровообращения в виде венозного полнокровия, интерстициальный отек и очаговые дистрофические изменения в кардиомиоцитах (снижение восприимчивости цитоплазмы клеток эозина, снижение поперечной исчерченности вследствие набухания внутриклеточных структур, в том числе сократительных миофибрилл).

Выявленные нами изменения указывают на поражение миокарда по типу миокардиодистрофии.

Под влиянием Г-КСФ у животных наблюдалась несколько иная картина. В эндокарде эндотелиальная выстилка сохранена; в миокарде — равномерное кровенаполнение сосудов микроциркуляторного русла, то есть в большинстве случаев дистрофические изменения в кардиомиоцитах отсутствуют или носят мелкоочаговый характер, интерстициальный отек миокарда слабо выражен.

Заключение. Введение Г-КСФ в посттравматическом периоде приводило к уменьшению дистрофических нарушений в миокарде. В основе этого, как следует из экспериментальных данных, лежит активация неоангиогенеза и микроциркуляции, возможно, вследствие усиления дифференцировки клеток-предшественников в эндотелиоциты.

РАЗВИТИЕ ПРЕДСТАВЛЕНИЙ О РОСТОВОМ ФАКТОРЕ СОСУДИСТОГО ЭНДОТЕЛИЯ (VEGF)

Киселева Е.П., Людыно В.И., Старикова Э.А., Крылов А.В.

НИИ экспериментальной медицины РАМН, Санкт-Петербург, Россия

VEGF как основной ангиогенный фактор считается главной мишенью антиангиогенной терапии. Для лечения опухолей и других заболеваний, связанных с повышенным ангиогенезом, были созданы различные лекарственные препараты, блокирующие действие VEGF в организме. Считается, что их противоопухолевое действие связано с ингибированием роста сосудов, но не самих раковых клеток, поскольку VEGF ростовым фактором для большинства опухолевых клеток не является.

Постепенно стали появляться данные о том, что хотя VEGF и не влияет прямо на пролиферацию опухолевых клеток, но тем не менее может влиять на их способность метастазировать, поскольку на них были обнаружены рецепторы VEGF. Было установлено, что VEGF регулирует подвижность, трансэндотелиальную миграцию, инвазивную способность и выживаемость раковых клеток. Так сформировалось представление о VEGF как о регуляторе миграции клеток, причем не только трансформированных, но и нормальных. VEGF является хемоаттрактантом и стимулятором трансэндотелиальной миграции моноцитов, эозинофилов, базофилов, а также эндотелиальных и гемопоэтических предшественников из костного мозга. Рецепторы VEGF обнаружены на многих клетках иммунной системы, а нейропиплин-1 считается маркером Т-регуляторных клеток. VEGF способен привлекать различные клетки в очаг гипоксии и тканевого повреждения, а в отсутствие воспаления осуществляет важную физиологическую роль поддержания сосудистого гомеостаза. В частности, известно, что VEGF усиливает сосудистую проницаемость для коллоидных белков в 50 тысяч раз сильнее, чем гистамин. Можно предположить, что осложнения от применения антиангиогенной терапии могут быть связаны с недооценкой роли этого фактора.

Поскольку нейропиплин-1 взаимодействует также и с другим лигандом, а именно семафорин-III, эффекты VEGF начали рассматривать уже не изолированно, а совместно с нейрональным фактором. Если VEGF характеризуется в настоящее время как хемоаттрактант

и усилитель клеточной миграции, то семафорин III обладает противоположными эффектами, являясь хеморепеллентом и ингибитором миграции для ряда клеток. Так сформировалась гипотеза о том, что способность раковых клеток к метастазированию определяется балансом содержания VEGF и семафорина III в опухолевой ткани. Возможно, что в ближайшем будущем набор таких показателей, как экспрессия в опухоли изоформ VEGF, семафорина и их рецепторов, станет рутинным методом для обоснования прогноза и лечебной тактики у онкологических больных.

Таким образом, за последние 20 лет к представлениям о VEGF как о факторе сосудистой проницаемости были добавлены новые знания о нем как об индукторе ангиогенеза и затем как о регуляторе клеточной миграции, что в целом его характеризует как важнейший защитный фактор воспаления и репаративных процессов.

Работа поддержана грантом РФФИ № 09-04-00429.

ОПУХОЛЕВЫЕ АНТИГЕНЫ РАКА ЯИЧНИКОВ И МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ КАК ПОТЕНЦИАЛЬНЫЕ МИШЕНИ ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ И ИММУНОТЕРАПИИ

Киямова Р.Г.¹, Гришкова В.С.¹, Костянец О.И.¹, Литуев Д.С.¹, Риттер Г.², Гут И.Т.³, Филошенко В.В.¹

¹ *Институт Молекулярной биологии и генетики НАН Украины, г. Киев, Украина*

² *Людвиговский институт раковых исследований, г. Нью-Йорк, США*

³ *Университетский колледж Лондона, г. Лондон, Великобритания*

Опухолевые антигены — это молекулы, как правило, белковой природы, которые в результате мутаций, модификаций или измененной экспрессии служат мишенями для клеток иммунной системы в процессе распознавания и уничтожения опухоли. На сегодняшний день для поиска опухолевых антигенов используются новые подходы, такие как метод белковых микрочипов, SEPR (серологический протеомный анализ), SEREX (серологическая идентификация рекомбинантно экспрессируемых клонов), фаговый дисплей и другие. Опухолевые антигены и моноклональные антитела к ним находят все большее применение при диагностике и лечении онкологических заболеваний.

Целью нашей работы было — идентифицировать и охарактеризовать неизвестный антиген, распознаваемый в большинстве случаев рака яичников моноклональными антителами MX35, полученными при иммунизации мышей клетками карциномы яичников, а также опухолевые антигены медуллярной карциномы молочной железы, сильная инфильтрация которой лимфоцитами может указывать на экспрессию опухолевых антигенов. Для этого за основу была взята методология SEREX. Были поставлены следующие задачи: создать кДНК библиотеки медуллярной карциномы молочной железы и клеточной линии рака яичников OVCAR3, которая экспрессирует MX35 антиген; скринировать их или аутологичной сывороткой крови или соответственно MX35 антителами; охарактеризовать выявленные антигены.

В результате работы нами была выявлена молекулярная природа гипотетического MX35 антигена и показано, что это натрийзависимый транспортер фосфатов NaPi2b.

Идентичность МХ35 антигена и транспортера фосфатов NaPi2b была доказана несколькими методами, включая масс-спектрометрию, РНК-интерференцию, иммуногистохимический анализ, а также типирование клеточных линий методом ОТ-ПЦР. Проанализированы все известные на сегодняшний день мутации в кодирующей части гена транспортера, ассоциированные с раком яичника. Показано, что одна из мутаций в гене NaPi2b – аминокислотная замена Т330V – приводит к исчезновению антигенной детерминанты для МХ35 антител. Мы картировали район эпитопа МХ35\NaPi2b антигена, распознаваемый моноклональными антителами МХ35, а также показали дифференциальный профиль экспрессии NaPi2b в разных типах рака яичников.

Для идентификации антигенов медуллярной карциномы молочной железы мы модифицировали SEREX метод с целью создания истощенной против генов иммуноглобулинов кДНК библиотеки, поскольку сильная инфильтрация этой опухоли лимфоцитами делает невозможным скрининг библиотеки из-за большого количества клонов, соответствующих генам иммуноглобулинов. Скрининг истощенной кДНК библиотеки аутологичной сывороткой позволил выявить 59 положительных клонов, которые соответствовали 42 разным генам. Белковые продукты генов охарактеризованы с использованием аллогенных сывороток здоровых доноров и больных медуллярной карциномой молочной железы. Наиболее перспективные из них отобраны для дальнейшего изучения.

Идентифицированные антигены могут быть потенциальными мишенями для диагностики и иммунотерапии рака яичников и молочной железы.

MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS И MYCOBACTERIUM AVIUM: ЗЕРКАЛЬНАЯ ГЕНЕТИКА ХОЗЯИНА, ЗЕРКАЛЬНЫЙ ПАТОГЕНЕЗ

Кондратьева Е.В., Майоров К.Б., Авербах М.М., Логунова Н.Н., Капина М.А., Апт А.С.

Центральный НИИ туберкулеза РАМН, Москва, Россия

Mycobacterium tuberculosis и *Mycobacterium avium* – два родственных вида микобактерий, вызывающих у человека и животных заболевания с преимущественно легочной локализацией. Если возбудитель туберкулеза *M. tuberculosis* поражает хозяина даже в отсутствие видимых нарушений иммунитета, то *M. avium* – условно патогенный возбудитель, вызывающий заболевания при иммунодефицитах. Нами было показано, что, несмотря на близкое родство двух видов бактерий, восприимчивость к ним совершенно по-разному контролируется хозяином. Мыши инбредной линии В6 чувствительны к *M. avium*, но резистентны к *M. tuberculosis*; тогда как мыши линии I/St имеют зеркальный фенотип. Такой же характер имеет распределение параметров иммунного ответа и патологии легких, а также уровень бактерицидной активности легочных макрофагов у этих животных. Генетический анализ показал, что инфекция, вызываемая *M. avium*, контролируется прежде всего геном Nramp1 первой хромосомы, а комплекс Н2 выступает в роли локуса-модификатора. При туберкулезной инфекции генетический контроль имеет полигенный характер, и МНС выступает в роли одного из главных контролируемых элементов, причем весьма вероятно участие более чем одного гена в составе МНС.

ВЛИЯНИЕ КОМПЛЕКСА АНТИГЕНОВ СТАФИЛОКОККА НА ИММУНОФЕНОТИП МОНОНУКЛЕАРНЫХ ЛЕЙКОЦИТОВ

Кузьменко О.М., Ахматов Э.А., Грубер И.М., Куныгина О.В.¹, Лебединская Е.А., Кабановская И.Н.¹, Некрасов А.М.¹, Бродовский М.В.¹, Уткина Н.П.¹

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

¹ ГОУ ВПО «ПГМА им. акад. Е.А. Вагнера Росздрава», г. Пермь, Россия

Возбудитель стафилококка отличается резистентностью к широкому спектру антибиотиков, а клиническое течение стафилококковой инфекции характеризуется многообразием – от легких до тяжелых, генерализованных форм. Это определяет необходимость комплексной терапии данной патологии, сочетающей использование бактериостатических препаратов и активаторов (корректоров) иммунной системы, влияющих, в первую очередь, на эффекторы врожденного иммунитета, осуществляющих процессинг и презентацию антигена Т-лимфоцитам, а следовательно, через них – на формирование адаптивного иммунитета.

Цель: исследование изменения иммунофенотипа мононуклеарных лейкоцитов селезенки мышей (МЛ) под воздействием комплекса антигенов стафилококка (КАГС) *in vitro*. Использовали антигены *S. aureus* (КАГС 41, 45) с полноценной питательной среды на основе панкреатического гидролизата казеина и дрожжевого экстракта с глюкозой и антигены, полученные при культивировании *S. aureus* на ферментере (КАГСф1). Оценку субпопуляционной структуры лимфоцитов осуществляли методом проточной цитометрии с применением моноклональных антител (МКА) (фирмы «Caltag Laboratories», США) против клеточных антигенов.

При культивировании МЛ с 10 мкг/мл КАГС41 или КАГС45 в течение 48 часов повышалось содержание клеток, экспрессирующих CD3 в 1,75 и 1,95 раза, а NK 5,3 и 5,6 раза соответственно. КАГС1ф (10 мкг/мл) эти показатели повышал незначительно и они значительно не отличались ни от контрольной группы (интактные клетки), ни от других активированных КАГС МЛ. Уровень NKT (CD3/NK), CD25 клеток значительно увеличивался только у КАГС45 (в 9 и 6,9 раза). Молекула МНСII повышалась у КАГС45 и КАГС1ф более 2 раз. По содержанию CD19 В-клеток отличались КАГС41 и КАГС1ф, уровень которых возрастал почти в 2 раза по сравнению с контролем и в 1,5 раза – по сравнению с КАГС45. Только по числу CD4- и CD8- лимфоцитов все три КАГС значительно повышали их уровень относительно интактных клеток, а по количеству $\gamma\delta$ T (TCR)- и CD5 (B1)-лимфоцитов их значения существенно не отличались ни от интактных клеток, ни между собой.

Следует отметить, что все КАГС по исследованным маркерам в той или иной степени активировали Т (Th, CTL)-, NKT-, В-лимфоциты. При этом на клетках экспрессировались как ранний (CD25), так и поздний маркер активации клеток (МНСII). Эти данные свидетельствуют о способности КАГС активировать эффекторы и врожденного, и адаптивного иммунитета, что является важным требованием при разработке вакцин и иммуномодулирующих препаратов микробного происхождения.

РЕГУЛЯТОРНОЕ ДЕЙСТВИЕ ТРОМБОСПОНДИНА-1 НА АКТИВАЦИЮ Т-ЛИМФОЦИТОВ

Кузнецова С.А.

НИИ экспериментальной медицины РАМН,
Санкт-Петербург, Россия

Тромбоспондин-1 (TSP-1) является гликопротеином внеклеточного матрикса, который способен как положительно, так и отрицательно регулировать адгезию, миграцию, пролиферацию и выживаемость различных типов клеток, включая клетки иммунной системы. Многие клетки организма секретируют TSP-1, и его экспрессия преимущественно выражена в местах тканевого повреждения и восстановления (репарации). Многие клетки крови и их предшественники обладают способностью как продуцировать TSP-1, так и взаимодействовать с ним. Появляется все больше доказательств того, что взаимодействия TSP-1 с другими компонентами внеклеточного матрикса приводит к его конформационным изменениям и как следствие может регулировать специфические биологические функции TSP-1. Учитывая способность некоторых рекомбинантных фрагментов и пептидов молекулы TSP-1 демонстрировать активности отличные от нативного белка и, с другой стороны, противоречивые литературные данные относительно того, является ли TSP-1 стимулятором или ингибитором функционирования Т-клеток, целью настоящего исследования было сравнение регуляторных эффектов на Т-лимфоциты как растворимой, так и иммобилизованной форм TSP-1. Действительно, были обнаружены функциональные различия в зависимости от того, в каком контексте TSP-1 был представлен клеткам линии Jurkat. Иммобилизованный TSP-1 значительно ингибирует уровни экспрессии маркеров активации Т-клеток, включая CD69, IL-2, IL-22 и TNF α , индуцированные анти-CD3-антителами отдельно или в комбинации с анти-CD28-антителами. Растворимая форма TSP-1, напротив, способствует дополнительному усилению активации Т-клеток линии Jurkat. Для того чтобы разобраться в механизмах данной регуляции, сравнили влияние нативной молекулы TSP-1 с рекомбинантным тримерным фрагментом NoC1, который содержит N-терминальные домены TSP-1. При стимуляции Т-клеток линии Jurkat анти-CD3-антителами отдельно или в комбинации с анти-CD28-антителами в присутствии иммобилизованного фрагмента NoC1 было обнаружено значительное снижение уровней экспрессии CD69 и IL-2, в то время как синтез IL-22 практически не изменялся. Полученные результаты убедительно демонстрируют, что взаимодействие N-терминального участка молекулы TSP-1 с соответствующими рецепторами (интегринами и/или гепарансульфат протеогликанами) в данном случае является необходимым, но недостаточным, и взаимодействие С-терминального участка молекулы с соответствующим рецептором на поверхности клеток (CD47) так же необходимо для реализации некоторых ингибирующих эффектов. Проведенное исследование показало потенциальную возможность TSP-1, компонента внеклеточного матрикса и ингибитора ангиогенеза, проявлять как стимулирующее, так и ингибирующее действие на специфическую активацию Т-лимфоцитов в зависимости от конформационных изменений молекулы и микроокружения.

МЕЛАТОНИН И ГЕМОПОЭТИЧЕСКИЕ КЛЕТКИ-ПРЕДШЕСТВЕННИКИ КОСТНОГО МОЗГА: ВОЗМОЖНЫЕ ПУТИ ВЛИЯНИЯ

Лабунец И.Ф., Бутенко Г.М.

Государственное учреждение «Институт генетической и регенеративной медицины АМН Украины»,
г. Киев, Украина

Введение. Известно, что мелатонин усиливает образование гемопоэтических клеток-предшественников в костном мозге, опосредуя это влияние через Т-хелперы органа [Maestroni et al., 2005]. Вместе с тем стромальные фибробласты также являются важным компонентом микроокружения костного мозга, которые контролируют гемопоэз. Более того, многие эффекты мелатонина на функции иммунной системы реализуются через гормоны тимуса. Так, показано, что нарушение дифференцировки стволовых клеток в гранулоцитарно-макрофагальном направлении у тимэктомированных животных можно восстановить с помощью биологически активных факторов тимуса, которые, в свою очередь, усиливают образование Т-хелперов.

Цель и задачи. Изучить значение клеток микроокружения костного мозга и гормонов тимуса во влиянии мелатонина на гемопоэтические клетки-предшественники у взрослых мышей. Для этого необходимо:

1. Исследовать *in vivo* и *in vitro* влияние мелатонина на количество CD4⁺ клеток, стромальных фибробластов и гемопоэтических предшественников в костном мозге мышей.

2. Оценить уровень тимического гормона в крови мышей после введения мелатонина, а также возможность его прямого влияния на клеточный состав костного мозга.

Материалы и методы. Исследования проведены на взрослых (4–5 мес.) мышах линии СВА. Сезон – зима. Мелатонин (фирмы «Sigma», США) вводили в 16.00 ч однократно, внутривентриально, в дозе 50 нг/100 г массы (n = 10). Контроль – 0,9 % раствор хлорида натрия (n = 10). Через сутки в клетках, выделенных из костного мозга бедренной кости контрольных и опытных мышей, определяли количество стромальных клеток-предшественников для колоний фибробластов (КОК-Ф) методом культивирования клеток в монослойных культурах и число клеток-предшественников для гранулоцит-макрофагальных колоний (КОК-ГМ) – в агаровых культурах; с помощью биотинированных моноклональных антител к L3T4 (фирмы «Sigma», США) в суспензии костномозговых клеток определяли число CD4⁺ клеток иммунофлуоресцентным методом. В сыворотке крови мышей оценивали титр тимического сывороточного фактора (ТСФ). В опытах *in vitro* клетки, выделенные из костного мозга интактных взрослых мышей (n = 10), инкубировали с мелатонином (125 пг) или супернатантом трехчасовых культур стромы тимусов интактных взрослых мышей, который содержал ТСФ. После инкубации в костномозговой суспензии определяли число КОК-Ф, КОК-ГМ и CD4⁺ клеток указанными методами. Контроль – значения показателей без добавления соответствующих факторов.

Результаты. *In vivo.* Инъекция мелатонина приводит к существенному повышению количества CD4⁺ клеток в костном мозге мышей (с 6,6±1,2% до 10,2±0,6%, p < 0,05). Абсолютное число КОК-Ф в органе контрольных и опытных мышей составило соответственно 401,8±42,6

и $507,0 \pm 67,6$, КОК-ГМ – 2757 ± 462 и 2474 ± 647 . Изменение в соотношении количества КОК-ГМ и КОК-Ф в указанных группах (с $7,1 \pm 1,7$ до $4,9 \pm 1,4$) говорит о сдвиге в балансе этих клеток под влиянием мелатонина в сторону обогащения костного мозга стромальными предшественниками. Последний факт может иметь «опережающее» значение относительно усиления процесса гемопоэза весной. Так, по нашим данным, для количества КОК-Ф и КОК-ГМ в костном мозге взрослых мышей характерен цирканнуальный ритм с пиками первых зимой и летом и последних – весной и осенью [Бутенко Г.М., Лабунец И.Ф. и др., 2000]. При этом весной количество КОК-ГМ в костном мозге в 1,9 раза выше, чем зимой. Уровень ТСФ в крови (\log_2 титра) мышей, получивших мелатонин, выше, чем в контрольной группе (соответственно $5,3 \pm 0,3$ и $4,3 \pm 0,3$, $p < 0,05$). У тимэктомированных мышей количество КОК-Ф уменьшается ($p < 0,05$) [Лабунец И.Ф. и др., 2005]. *In vitro*. Мелатонин *in vitro* увеличил в костномозговой суспензии долю $CD4^+$ клеток ($p < 0,05$) и не изменил количество КОК-Ф ($p > 0,05$), что говорит о разных путях влияния мелатонина на определенные клетки микроокружения костного мозга. Тимический супернатант, содержащий ТСФ, увеличил *in vitro* количество КОК-Ф и не изменил количество КОК-ГМ в суспензии костного мозга.

Заключение. Во взрослом организме влияние мелатонина на гемопоэтические клетки-предшественники опосредовано такими составляющими микроокружения костного мозга, как Т-хелперы и стромальные фибробласты. Если действие гормона на Т-хелперы реализуется непосредственно, то на стромальные фибробласты опосредованно, через повышение уровня ТСФ.

ПРОДОЛЖИТЕЛЬНОСТЬ ЛАТЕНТНОГО ПЕРИОДА ИГРАЕТ КЛЮЧЕВУЮ РОЛЬ ПРИ ИММУНОТЕРАПИИ ИНТЕРЛЕЙКИНОМ-2 В ПЕРЕВИВАЕМОЙ И СПОНТАННОЙ МЫШИНЫХ МОДЕЛЯХ РАКА МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

Лазарев В.Ф., Семушина С.Г., Шигабутдинов А.Ф., Кесслер Ю.В., Чадаева А.В., Моисеева Е.В.
ИБХ РАН, Москва, Россия

Известно, что иммунотерапия интерлейкином-2 (IL-2) эффективна при лечении меланомы и рака почки, а в клинике рака молочной железы (РМЖ) этот метод признания не получил в связи с неоднозначностью получаемых результатов. Мы полагаем, что адекватные мышиные модели РМЖ могут прояснить ситуацию. Нашей целью было протестировать эффективность однократной перитуморальной инъекции IL-2, сравнив результаты на перевиваемой и спонтанной мышиных моделях РМЖ, при этом выявляя зависимость успеха иммунотерапии от продолжительности латентного периода (ЛП) опухоли.

Перевиваемая модель: 26 самцам BLRB перевели опухолевые клетки из сингенной спонтанной аденокарциномы молочной железы (АКМЖ) самки. На 14-й день у половины самцов опухоли достигли видимого проявления ($5 \pm 0,5$ мм) – короткий ЛП. 7 самцам однократно ввели $0,5$ мл физиологического раствора, содержащего $2,5 \times 10^6$ МЕ IL-2, контрольной группе ($n = 6$) одновременно вводили физраствор в том же объеме. У оставшихся животных АКМЖ достигли видимого проявления после долгого латентного периода – лишь на 51-й день. 6 самцов пролечили IL-2, контролем служили непролеченные животные ($n = 7$).

Спонтанная модель: 23 самки линий BLRB, BLRB и CBRB с АКМЖ, находящейся на разных стадиях прогрессии, одновременно получили такую же дозу препарата. Динамику роста опухолей и выживания пролеченных самок сравнивали с соответствующими параметрами исторического контроля ($n = 42$).

В перевиваемой модели пролеченные самцы с коротким ЛП роста опухоли выжили достоверно лучше контрольных, тенденция к противоположному эффекту IL-2 была обнаружена у опухоленосителей с долгим ЛП. Аналогично в спонтанной модели успех иммунотерапии зависел от продолжительности ЛП, хотя сравнение скорости роста и выживания в среднем по группам (опыт и контроль) не выявило различий.

Мы заключили, что иммунотерапия путем однократной перитуморальной инъекции IL-2 была эффективна лишь в случае опухолей с коротким латентным периодом. Применение перевиваемой модели при условии использования опухоли, перевитой непосредственно из спонтанной самцам-реципиентам, было оправдано.

НОВЫЕ ЛИНИИ МЫШЕЙ, КОНГЕННЫЕ ПО ГЛАВНОМУ КОМПЛЕКСУ ГИСТОСОВМЕСТИМОСТИ (H2), ОТЛИЧАЮТСЯ ПО ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ К МИКОБАКТЕРИЯМ

Логунова Н.Н., Капина М.А., Кондратьева Е.В., Коротецкая М.В., Апт А.С.

Центральный научно-исследовательский институт туберкулеза РАМН, Москва, Россия

Влияние главного комплекса гистосовместимости (МНС) на восприимчивость к *M. tuberculosis* и тяжесть течения инфекции была выявлена в ряде генетических исследованиях на человеке и мыши. Геномный скрининг с использованием расщепляющегося потомства чувствительной линии мышей I/St и резистентной линии A/Sn позволил выявить три генетических локуса хромосом 3, 9 и 17, влияющих на заболевание. Локус хромосомы 17 был картирован в районе, занятом МНС. Для идентификации генов, обуславливающих чувствительность мышей I/St, была выведена панель рекомбинантных конгенных линий мышей, у которых были перенесены различные участки хромосомы 17 (между 8,6–65 Мб) от чувствительной линии I/St на резистентную генетическую основу мышей C57BL/6 и наоборот. При анализе фенотипов новых линий оказалось, что линии мышей B6.I-H2ⁱ, несущие сегмент I/St: 33,6–44 Мб на основе C57BL/6, имеют промежуточный фенотип по отношению к двум исходным линиям: среднее время выживания после аэрогенного заражения: I/St = 135, B.I = 160 и C57BL/6 > 250 дней соответственно. Линии B6.I отличались также более быстрой потерей веса, количество микобактерий в их легких было выше в 10 раз, чем у мышей C57BL/6. Гистологическое исследование зараженных легких показало, что как и у мышей C57BL/6, у мышей B6.I развивался воспалительный процесс со смешанным характером клеточной инфильтрации вокруг сосудов и бронхов и образованием В-клеточных фолликулов. Однако у конгенных мышей B6.I воспаление имело более выраженный характер, процесс затрагивал большие по площади зоны, дыхательная поверхность была резко сокращена. Легкие зараженных мышей C57BL/6 содержали больше Т-лимфоцитов $CD4^+$, продуцирующих TNF α по сравнению с мышами линий B6.I.

Дефицит этих клеток может быть одним из факторов, приводящих к неблагоприятному течению процесса у последующих.

Таким образом, на панели новых конгенных линий подтверждается, что один из локусов, контролирующих восприимчивость к туберкулезу, находится в сегменте МНС 17-й хромосомы мыши.

СУБПОПУЛЯЦИИ ЭФФЕКТОРНЫХ Т-ЛИМФОЦИТОВ: СТЕПЕНЬ ДИФФЕРЕНЦИРОВКИ ОПРЕДЕЛЯЕТ ФУНКЦИОНАЛЬНУЮ И ПРОТЕКТИВНУЮ АКТИВНОСТЬ

Лядова И.В., Капина М.А., Васильева И.А.

ГУ ЦНИИ туберкулеза РАМН, Москва, Россия

Лимфоциты Th-1 играют важную роль в протективном иммунном ответе и в то же время являются основным патогенетическим звеном в развитии многих аутоиммунных и воспалительных заболеваний. В связи с этим понимание механизмов образования, регуляции активности и гомеостаза функционально-активных лимфоцитов Th-1 имеет большое значение. В настоящей работе на модели туберкулезной инфекции исследовали дифференцировку, функциональную активность, поверхностный фенотип и миграцию эффекторных лимфоцитов Th-1.

Показано, что на основе экспрессии различных дифференцировочных маркеров можно выделить несколько субпопуляций эффекторных лимфоцитов CD4 (лимфоциты CD44⁺CD62L⁻/CD45RO⁺CD62L⁻), различающихся по уровню экспрессии молекул CD27, CD28, CD57. Эффекторные лимфоциты CD27⁻ образуются из лимфоцитов CD27⁺. Дифференцировка CD27⁺ → CD27⁻ происходит в легочной ткани, зависит от антигенного стимула и сопровождается активацией Т-лимфоцитов, увеличением продукции ими эффекторных цитокинов TNF α , IFN γ , IL-17, появлением у Т-клеток способности стимулировать антимикобактериальную активность макрофагов. Таким образом, эффекторные лимфоциты с фенотипом CD27⁻(CD28⁺CD57⁻) представляют собой зрелые функционально-активные лимфоциты Th-1. Дальнейшая дифференцировка эффекторных лимфоцитов CD27⁻ сопровождается изменением экспрессии на них молекул CD28 и CD57, полной потерей клеткой способности продуцировать IFN γ , появлением у клетки других типов активности, которая может вызывать повреждение тканей и органов. Эти стадии дифференцировки можно рассматривать как терминальные стадии, сопровождающиеся истощением протективного иммунного ответа («exhaustion»). У больных туберкулезом накопление терминально дифференцированных эффекторных лимфоцитов наблюдается только при тяжелом и распространенном процессе. У больных с очаговыми формами туберкулеза и благоприятным течением процесса преобладают низкодифференцированные (CD45RO⁺CD62L⁻CD27⁺) и зрелые (CD45RO⁺CD62L⁻CD27⁻) эффекторные лимфоциты.

Таким образом, эффекторные лимфоциты представляют собой совокупность активированных клеток, находящихся на разных стадиях антигензависимой дифференцировки. Глубина (степень) дифференцировки эффекторных клеток определяет характер, силу и продолжительность Т-клеточного ответа. В докладе обсуждается, какие факторы детерминируют глубину дифференцировки эффекторных лимфоцитов, и каким образом она может влиять на течение заболевания.

ВЛИЯНИЕ VEGF НА АДГЕЗИЮ И МИГРАЦИОННУЮ АКТИВНОСТЬ ТИМОЦИТОВ МЫШЕЙ ПРИ ОПУХОЛЕВОМ РОСТЕ

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

НИИ экспериментальной медицины РАМН, Санкт-Петербург, Россия

Фактор роста эндотелия сосудов (VEGF) известен как основной ангиогенный фактор. Помимо этого показано, что он обладает рядом иммунорегуляторных функций, является хемоаттрактантом базофилов, моноцитов, эозинофилов. Кроме того, VEGF продуцируется многими опухолевыми клетками и способен вызывать инволюцию тимуса при опухолевом росте.

Целью данного исследования было изучение влияния VEGF на миграционную активность и адгезию тимоцитов мышей при опухолевом росте.

Работа проводилась на самцах мышей линии СЗНА, которым подкожно были инокулированы клетки сингенной опухоли гепатомы 22а в забуференном солевом растворе (ЗФР). Контрольные животные получали инъекцию ЗФР в том же объеме. Оценку влияния VEGF (R&D) на хемотаксис тимоцитов проводили с использованием поликарбонатных трансвеллов 24-луночного формата (Costar) с диаметром пор 5 мкм. В верхние камеры трансвеллов вносили тимоциты в культуральной среде (DMEM, 1% FCS), в нижние – исследуемый фактор. Планшеты с клетками инкубировали 4 часа в CO₂-инкубаторе. Оценку адгезии тимоцитов к эндотелию проводили в 24-луночных планшетах, при этом в лунки заранее вносили эндотелиальные клетки линии EA.hy 926 и инкубировали 24 часа до образования монослоя. Далее в лунки вносили тимоциты и инкубировали в течение 1 часа в присутствии различных концентраций VEGF. В качестве стандартного активатора эндотелия использовали TNF α в концентрации 50 ед/мл. Затем монослой отмывали от несвязавшихся тимоцитов и производили подсчет числа адгезировавших клеток.

Изучение миграционной активности тимоцитов проводили на третьей неделе опухолевого роста еще до появления признаков инволюции тимуса. Спонтанная миграция тимоцитов животных-опухоленосителей была ниже в 2 раза, чем интактных. VEGF в концентрации 10 нг/мл у интактных мышей не стимулировал миграцию клеток, тогда как у мышей с гепатомой 22а наблюдалось значительное усиление миграционной активности тимоцитов в 2,2 раза по сравнению со спонтанной миграцией. VEGF в концентрации 100 нг/мл увеличивал миграцию клеток и у интактных, и у животных-опухоленосителей в одинаковой степени. По предварительным данным, спонтанная адгезия тимоцитов у мышей с гепатомой 22а была ниже, чем у интактных животных. Адгезия тимоцитов мышей с гепатомой 22а в присутствии TNF α не отличалась от адгезии тимоцитов интактных мышей.

Таким образом, нами было показано, что у животных-опухоленосителей снижена спонтанная миграция и адгезия тимоцитов по сравнению с интактными животными, помимо этого, тимоциты мышей с гепатомой 22а оказываются более чувствительны к VEGF, чем тимоциты интактных животных. Возможно, VEGF играет важную роль в процессе эмиграции тимоцитов в ходе инволюции тимуса при опухолевом росте.

Работа поддержана грантом РФФИ № 09-04-00429.

ВЛИЯНИЕ 5-ОКСИМЕТИЛАУРАЦИЛА НА МИТОГЕННЫЙ ОТВЕТ И ЭКСПРЕССИЮ АКТИВАЦИОННЫХ АНТИГЕНОВ НА ЛИМФОЦИТАХ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ В СИСТЕМЕ *IN VITRO*

Мананова С.Ш.¹, Садовников С.В.², Сибиряк С.В.^{1,2}

¹ Институт иммунологии и физиологии УНЦ РАН, г. Екатеринбург, Россия

² Институт биохимии и генетики УНЦ РАН, г. Уфа, Россия

5-оксиметилурацил (2,4-диоксо-5-гидрокси-6-метил-1,2,3,4-тетрагидропиримидин, иммурег, ОМУ) является синтетическим производным пиримидина и обладает широким спектром фармакологических активностей, включающим способность стимулировать лейкопоз, регенерацию, иммуностимулирующую активность (особенно в условиях иммуносупрессии), антикатаболическое действие, антиоксидантный эффект. Клеточные механизмы действия ОМУ малоизвестны.

В системе *in vitro* изучено влияние ОМУ на митогенный ответ лимфоцитов периферической крови здоровых доноров (Alamar blue Assay), оценена интенсивность апоптоза и структура клеточного цикла (окрашивание йодистым пропидием), проведен субпопуляционный анализ активированных клеток и влияние препарата на спонтанную и индуцированную ФГА-Р экспрессию CD25 и CD69 на Т-лимфоцитах (проточная цитофлуориметрия).

Установлено, что в концентрации 0,01 мкг/мл, 0,1 мкг/мл, 1 мкг/мл и 10 мкг/мл ОМУ угнетает митогенный ответ Т лимфоцитов при стимуляции анти-CD3 МКА (клон ICO-90, 2 мкг/мл) на 15% ($p = 0,02$), 15,4% ($p = 0,008$), 10% ($p = 0,06$) и 16,4% ($p = 0,02$) соответственно. В меньшей степени ОМУ подавлял митогенный ответ при стимуляции ФГА-Р (статистически значимое угнетение наблюдалось лишь в присутствии 0,1 мкг/мл препарата в культуре). Ингибиторный эффект ОМУ был связан не с индукцией апоптоза, но сопровождался снижением «митотического потенциала» клеток – препарат увеличивал содержание клеток, находящихся в фазе покоя и пресинтетической фазе клеточного цикла и снижал содержание митотически активных клеток. В культурах лимфоцитов, стимулированных ФГА-Р, ОМУ не вызывал значимых изменений соотношения CD3⁺Т-лимфоцитов и CD19⁺В-лимфоцитов в регионе активированных клеток. Однако в культурах лимфоцитов, стимулированных анти-CD3 МКА, в присутствии ОМУ наблюдалось изменение соотношения между популяциями активированных Т-клеток в зависимости от концентрации препарата. Так, в минимальной концентрации ОМУ преимущественно снижал митогенез CD4⁺Т-лимфоцитов. В концентрациях 0,1 и 1 мкг/мл ОМУ подавлял митогенез CD8⁺ Т-лимфоцитов. В культурах, содержащих 10 мкг/мл препарата, соотношение между активированными субпопуляциями Т-клеток было аналогично таковому в контрольных культурах.

ОМУ снижал активационно-индуцированную экспрессию α -цепи рецептора IL-2 (CD25) на CD3⁺Т-лимфоцитах (преимущественно на CD8⁺Т-лимфоцитах), однако в условиях 3-часовой стимуляции ФГА-Р при внесении в культуру в концентрациях 1 и 10 мкг/мл увеличивал спонтанную, а при внесении в культуру во всем диапазоне концентраций незначительно, но статистически значимо увеличивал активационно-индуцированную экспрессию CD69 на Т-лимфоцитах

(на 10-15%, в зависимости от концентрации). Основной «вклад» в это увеличение вносили цитотоксические/супрессорные CD8 лимфоциты, в меньшей степени эффект проявлялся в отношении CD4⁺Т-лимфоцитов

Ингибиторный эффект ОМУ, который является ингибитором дигидроурацилдегидрогеназы и активирует запасные пути синтеза пиримидинов в клетки, на пролиферативную активность лимфоцитов в системе *in vitro* может быть связан с изменением баланса между вне- и внутриклеточным пулом пиримидинов в активированных клетках, что приводит к торможению клеточного цикла. Кроме того, ранние изменения экспрессии CD69, транслокация которого из цитоплазмы на мембрану сопряжена не только с активацией TCR и лектиновых рецепторов, но и с изменением свойств клеточной мембраны, позволяют предположить, что ОМУ может воздействовать на пуриновые/пиримидиновые рецепторы P2Y и P2X семейств.

ЭКСПРЕССИЯ ГЕНА АПОЛИПОПРОТЕИНА А-I ЧЕЛОВЕКА В КЛЕТКАХ ТНР-1

Могиленко Д.А.¹, Орлов С.В.¹, Трулев А.С.², Кудрявцев И.В.², Перевозчиков А.П.¹

НИИ экспериментальной медицины РАМН, отдел биохимии¹, отдел иммунологии², Санкт-Петербург, Россия

Аполипопротеин А-I (апоА-I) является главным белковым компонентом липопротеинов высокой плотности человека, которые принимают участие в обратном транспорте холестерина, включая его отток из моноцитов и макрофагов в стенке сосуда. АпоА-I способен ингибировать продукцию провоспалительных цитокинов (TNF α и IL-1 β) моноцитами/макрофагами после их контактного взаимодействия с активированными Т-лимфоцитами. Существует предположение, что апоА-I может играть роль конститутивного противовоспалительного фактора, уменьшение уровня которого в плазме крови может быть причиной возможного развития хронического воспалительного процесса. Несмотря на это, экспрессия эндогенного апоА-I в клетках моноцитарно-макрофагального ряда до настоящего времени не была показана.

В данной работе мы впервые показали, что ген апоА-I человека на умеренном уровне экспрессируется в клетках ТНР-1 (моноцитарно-макрофагальная линия клеток человека) как на уровне мРНК, так и на уровне белка. Используя методы непрямой иммунофлуоресценции, конфокальной микроскопии и проточной цитофлуориметрии, было показано, что синтезированный белок апоА-I в клетках ТНР-1 локализуется как в виде внутриклеточных включений (в 55,3% клеток), так и на поверхности клеточной мембраны (в 86,6% клеток). Обработка клеток ТНР-1- β -метил-циклодекстрином приводит к уменьшению содержания белка апоА-I на клеточной мембране примерно в 2,5 раза по сравнению с контрольными клетками, что свидетельствует об ассоциации апоА-I с мембранными рафтами. Количественный RT-PCR-анализ показал, что уровень мРНК апоА-I в клетках ТНР-1 возрастает в 5,4 \pm 1,1 раза по сравнению с контрольным уровнем через 24 ч после добавления TNF α (10 нг/мл). Добавление блокирующих антител к TNF α полностью отменяет эффект активации экспрессии гена апоА-I при действии TNF α . Под действием TNF α возрастает также и число клеток, позитивных по белку апоА-I

(до 91,4% с мембранной и 69,8% с внутриклеточной локализацией апоА-I). При дифференцировке моноцитарной линии клеток ТНР-1 в макрофаги под действием форболового эфира базальный уровень мРНК апоА-I возрастает в $4,2 \pm 0,3$ раза по сравнению с уровнем мРНК апоА-I в моноцитах, но при этом уменьшается число клеток, позитивных по белку апоА-I (до 61,6% с мембранной и 54,7% с внутриклеточной локализацией апоА-I).

Полученные нами результаты показывают, что уровень экспрессии и синтез апоА-I в клетках ТНР-1 увеличиваются при действии TNF α , что позволяет предположить возможную роль локально синтезированного клетками моноцитарно-макрофагального ряда апоА-I в регуляции процесса воспаления.

ВЛИЯНИЕ ИММОБИЛИЗАЦИОННОГО СТРЕССА НА СОСТОЯНИЕ КЛЕТОК СОЕДИНИТЕЛЬНОЙ ТКАНИ РАЗЛИЧНЫХ ОРГАНОВ

Мухлынина Е.А., Юшков Б.Г.

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

Современная физиология располагает значительными фактическими данными, отражающими разные стороны адаптации организма к действию экстремальных факторов. Достаточно хорошо исследована роль нервной, эндокринной, иммунной системы в регуляции адаптивных реакций. Вместе с тем есть основания предполагать, что важное место в этих процессах играет и соединительная ткань.

Целью нашего исследования было изучение влияния иммобилизационного стресса на состояние клеток соединительной ткани различных органов.

Материалы и методы исследования. Работа выполнена на 30 беспородных крысах-самцах массой 150-200 г. Иммобилизацию проводили путем привязывания крыс на спину на 6 часов. Для гистологического исследования и оценки реакции соединительной ткани через 6 часов и 2 суток после воздействия у животных забирали тимус, надпочечники, кожу и кишечник. Гистологические препараты окрашивали гематоксилин-эозином и азуром П. Определение плотности фибробластов, макрофагов, гранулоцитов, лимфоцитов и тучных клеток проводилось при увеличении в 1000 раз в 20 полях зрения с последующим пересчетом на единицу площади ($S = 0,01 \text{ мм}^2$). Для оценки значимости различий между группами использовали критерий Манна-Уитни. При проверке статистических гипотез использован 5% уровень значимости.

Результаты и их обсуждение. Полученные данные свидетельствуют о том, что в соединительнотканых перегородках тимуса через 6 часов после иммобилизации количество макрофагов значительно снижается по сравнению с интактными животными и до 2 суток остается на том же пониженном относительно контроля уровне. Также снижается и количество лимфоцитов соответственно в 4 и 3 раза по сравнению с контролем. Плотность фибробластов, гранулоцитов и тучных клеток при этом остается без изменений. В капсуле надпочечников через 2 суток после иммобилизации отмечается значимое снижение количества гранулоцитов в 4 раза. Содержание лимфоцитов также достоверно снижается в 2,5 раза на обоих сроках после воздействия. Плотность тучных клеток,

напротив, на протяжении всего времени исследования увеличивается. Изменений в содержании остальных исследованных клеточных элементов не отмечается. В кишечнике наблюдается увеличение плотности фибробластов уже на раннем сроке, через 2 суток плотность фибробластов продолжает нарастать. Количество макрофагов после иммобилизационного стресса также повышается. Количество лейкоцитов в кишечнике остается на уровне контроля. Через 6 часов после воздействия отмечается резкое увеличение плотности тучных клеток более чем в 20 раз. Через 2 суток количество мастоцитов снижается по сравнению ранним сроком, однако при этом остается выше уровня контроля. Кожа по общепринятым представлениям не относится к органам, вовлеченным в реакцию на стресс. После проведения иммобилизационного стресса не наблюдается изменений в содержании фибробластов и макрофагов соединительной ткани кожи. Однако при этом исследования показали, что в коже на раннем сроке после иммобилизации снижается количество гранулоцитов, содержание лимфоцитов уменьшается на обоих сроках. Плотность мастоцитов в коже через 6 часов несколько повышается, но уже через 2 суток отмечается снижение числа тучных клеток ниже уровня контроля.

Таким образом, иммобилизационный стресс приводит к значительным изменениям со стороны клеток соединительной ткани, которые проявляются как в органах, непосредственно вовлеченных в стресс-реакцию (тимус, надпочечники, кишечник), так и в напрямую не связанных с ней (кожа). При этом отмечается специфичность реакции различных клеточных элементов соединительной ткани в отдельных органах: в тимусе наблюдается снижение количества макрофагов и лимфоцитов, в надпочечниках и коже реакция соединительной ткани связана с лейкоцитарным звеном и тучными клетками, в соединительной ткани кишечника повышается содержание фибробластов, макрофагов и тучных клеток. Это дает основание предположить наличие различных механизмов участия данных клеток в общей реакции адаптации организма к действию иммобилизационного стресса.

ПЕНТРАКСИНЫ В ЗАЩИТНЫХ РЕАКЦИЯХ И ПРОЦЕССАХ ИММУНОРЕГУЛЯЦИИ

**Назаров П.Г., Пронина А.П., Трулев А.С.,
Пузырева В.П., Попов В.Г.**

*ГУНИИ экспериментальной медицины РАМН,
Санкт-Петербург, Россия*

Пентраксины представляют собой класс белков с пятилучевой симметрией молекул. Членами этого семейства являются белки плазмы крови и (или) клеточных мембран: С-реактивный белок (CRP), сывороточный Р-компонент амилоида (SAP), макрофагальный пентраксин РТХ3, пентраксин РТХ4, нейрональные пентраксины NP1, NP2, NPR. Для пентраксинов характерно наличие сродства с определенными лигандами – фосфорилхолином, поликатионамином, полианионамином, первым субкомпонентом первого компонента комплемента (C1q). Некоторые пентраксины (CRP, SAP) взаимодействуют с иммунокомпетентными клетками через Fc-рецепторы для иммуноглобулинов IgG (Fc-gamma-R). Пентраксины – эволюционно древние белки, они имеются у всех животных от беспозвоночных до человека. Одной из основных функций пентраксинов CRP и SAP и их гомологов у животных считают участие в противомикробной защите. Эту функцию они

выполняют путем адсорбции на поверхности бактерий, активации комплемента или комплементподобных белков, опсонизации, стимуляции фагоцитоза. У человека пентраксины связываются также с модифицированными липопротеинами плазмы (ЛПНП, ЛПОНП), что усиливает фагоцитоз и отложение липопротеинов в стенках сосудов. С этими процессами связывают роль CRP в атерогенезе. Лигандная активность является одной из причин вмешательства пентраксинов в процессы иммунорегуляции. Так, связывание пентраксинов с микробами ведет к снижению продукции протективных антител; связывание с апо-В-содержащими ЛП — к индукции аутоантител к ЛП; связывание с фосфорилхолином фосфолипидов — к ингибции фосфолипаз, в том числе клеточных, таких как фосфолипаза А2. CRP связывает также ацетилхолин (благодаря его сходству с фосфорилхолином), снижая физиологическую активность этого медиатора и уменьшая его кардиотропный и гипотензивный эффекты; вероятно, по этой причине введение CRP смягчает клиническую картину анафилактического шока у экспериментальных животных. Иммунорегуляторные эффекты пентраксинов являются также результатом неспецифического влияния на функциональную активность иммунокомпетентных клеток через Fc- γ -рецепторы и, возможно, другие мембранные структуры (например, липидсодержащие рафты мембран). В нейтрофилах пентраксины активируют экспрессию интегринов, усиливают адгезию и являются хемотаксантами для этих клеток. Нативный пентамерный CRP, но не его субъединицы, митогенен для лимфоцитов, активирует продукцию цитокинов, влияет на функциональную активность естественных киллеров. Пентраксины оказывают влияние на многие функции нейтрофилов (на фагоцитоз, хемотаксис, адгезию к клеткам эндотелия, экспрессию интегринов, продукцию кислородных радикалов), а также на базофилы, стимулируя дегрануляцию, выброс гистамина, цитокинов, активируя экспрессию мембранных маркеров CD63, CD203c, CD123 и др.

ХАРАКТЕРИСТИКА ЛИПОПОЛИСАХАРИДА (ЛПС) *B. PERTUSSIS* В СОСТАВЕ ВАКЦИННЫХ ПРЕПАРАТОВ ДЛЯ ПРОФИЛАКТИКИ КОКЛЮША

Назирова М.Р., Поддубиков А.В., Мерцалова Н.У., Бажанова И.Г., Шинкарев А.С.

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

Несмотря на высокий охват вакцинацией, в некоторых странах с широким использованием бесклеточных коклюшных вакцин (БКВ), содержащих высоко очищенные белки *B. pertussis*, отмечается рост заболеваемости коклюшем (de Melker, H.E., 1997). Одним из подходов по совершенствованию БКВ является введение в их состав в качестве антигена ЛПС или его аналогов. ЛПС является лигандом Toll-подобных рецепторов, активирует врожденный и Th-1-адаптивный иммунный ответ [Dillon S.A. и др., 2004] и обладает выраженными адьювантными свойствами в отношении антигенов, входящих в состав вакцинного препарата. В настоящее время актуальна проблема разработки критериев безопасного содержания ЛПС в вакцинных препаратах нового поколения для профилактики коклюша, допускающих присутствие ЛПС в дозах, не вызывающих усиления реактогенности и не приводящих к значительному снижению иммуногенных свойств вакцины. С помощью количе-

ственного хромогенного ЛАЛ-теста по конечной точке (Cambrex, США) проанализированы препараты 6 серий оригинальной бесклеточной коклюшной вакцины, разработанной в НИИВС им. И.И. Мечникова РАМН на этапах приготовления вакцины. Культуральная жидкость в среднем имела активность 108215 ± 7017 ЕЭ/мл, супернатант — 55142 ± 22296 ЕЭ/мл, таким образом, в результате отделения клеточного материала активность ЛПС снижалась на 49%. Полуфабрикаты БКВ после процедуры кислотного осаждения и детоксикации формалином имели активность 5265 ± 1880 ЕЭ/мл, то есть происходило снижение активности ЛПС на 90,45%, а с учетом того, что объем препарата уменьшался на 98%, содержание ЛПС на этой стадии снижалось на 99,8%. После сорбции на гидроокиси алюминия препарат БКВ содержал в среднем 906 ± 189 ЕЭ, таким образом, активность ЛПС снижалась еще на 82,8%. Конечный лиофилизированный препарат БКВ содержал в среднем 815 ± 148 ЕЭ (активность ЛПС в ЛАЛ-тесте снижалась на 10%). Принимая во внимание преимущества использованного теста, вместе с тем анализ полученных результатов позволяет констатировать, что использованный в работе тест не отражает истинного содержания ЛПС на конечных этапах приготовления вакцинного препарата (снижение активности после сорбции и лиофилизации). Следовательно, результаты, полученные для конечного препарата, нуждаются в коррекции, возможно, с введением поправочного коэффициента, либо контроль содержания ЛПС должен производиться на этапе, предшествующем сорбции препарата. В состав оригинальной отечественной БКВ входят антигены, полученные из культуральной жидкости, этот факт должен учитываться, так как известна неоднородность ЛПС для клеточных и внеклеточных форм бактерий (например, *Neisseria meningitidis*). Гетерогенность ЛПС должна учитываться и при определении активности в ЛАЛ-тесте, так, по нашим данным, активность ЛПС *B. pertussis* может превышать таковую у ЛПС *E. coli* используемого в качестве эталонного контроля в 10-50 раз.

ЭСТРИОЛ В РЕГУЛЯЦИИ ФУНКЦИЙ ИММУНОКОМПЕТЕНТНЫХ КЛЕТОК

Некрасова И.В., Ширшев С.В.

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

Эстриол (E_3) — один из основных гормонов беременности. Несмотря на его важную роль в процессах гестации, значение данного гормона в регуляции иммунных реакций при беременности остается малоизученным.

Цель работы — оценить влияние E_3 на активность миелопероксидазы (МПО), эластазы и катепсина G нейтрофилов, их фагоцитарную активность, а также экспрессию молекулы CD16 на CD3 лимфоцитах и продукцию интерлейкина (IL) — 10 аутологичными мононуклеарами.

Объектом изучения являлись сепарированные нейтрофилы и мононуклеары периферической крови небеременных женщин, выделенные на двойном градиенте плотности фикоколл-верографина. E_3 использовали в концентрациях, отражающих его уровни в крови в I и III триместрах беременности — 2 и 20 нг/мл соответственно. Активность ферментов, секретируемых нейтрофилами, определяли в клеточных супернатантах спектрофотометрическим методом. Фагоцитарную активность нейтрофилов определяли после часовой инкубации с E_3 по степени снижения

свечения люминесцентного генно-инженерного штамма бактерий *E. coli lux+* при их поглощении клетками. Мононуклеары также были проинкубированы с E_3 в течение часа, после чего их супернатанты были добавлены к интактным нейтрофилам. Концентрацию цитокинов в супернатантах мононуклеаров определяли с помощью иммуноферментного метода. Уровень CD3-CD16⁺ (NK) клеток оценивали в гейте лимфоцитов после суточной инкубации мононуклеаров в присутствии E_3 .

В результате установлено, что в спонтанном варианте обе исследуемые дозы E_3 повышали активность МПО и эластазы нейтрофилов, не влияя на активность катепсина G. При стимуляции клеток опсонизированным зимозаном E_3 повышал только активность МПО в дозе, характерной для III триместра беременности, не оказывая при этом действия на активность эластазы и катепсина G. В дозе, соответствующей I триместру беременности, гормон снижал процент NK-клеток, а также фагоцитарную активность нейтрофилов. Под действием супернатантов мононуклеаров, предварительно проинкубированных с E_3 , процент фагоцитирующих нейтрофилов также снижался. Причем действие супернатантов имело статистически более выраженный угнетающий эффект на уровень фагоцитирующих нейтрофилов, чем сам гормон. При этом E_3 в той же дозе повышал уровень IL-10 в часовых культурах аутологичных мононуклеаров. Показана достоверная отрицательная корреляция между процессами угнетения фагоцитоза и стимуляцией выброса IL-10, а также между повышением уровня цитокина и снижением процента CD3-CD16⁺ лимфоцитов. Можно предположить, что E_3 угнетает функциональную активность нейтрофилов и NK-клеток как самостоятельно, так и опосредованно через стимуляцию выброса IL-10 аутологичными мононуклеарами.

Таким образом, E_3 усиливает активность МПО и секретию нейтрофилами эластазы, которые принимают участие в ремоделировании тканей беременной матки. Одновременно можно отметить, что гормон является фактором, инициирующим девиацию Th-0 в Th-2 функциональный фенотип благодаря усиленной продукции IL-10 мононуклеарами периферической крови.

ЦИТОКИНЫ КАК ИММУНОАДЬЮВАНТЫ

Никитина Т.Н., Авдеева Ж.И., Алпатов А.А.

ФГУН ГИСК им. Л.А. Тарасевича, Москва, Россия

Вопрос развития адекватного иммунного ответа при вакцинации лиц с иммунодефицитным состоянием в настоящее время является актуальным. В связи с этим большое внимание уделяется поиску средств и методов, направленных на повышение эффективности вакцинопрофилактики. Широкий спектр иммунобиологических эффектов цитокинов обуславливает возможность использования их в качестве иммуноадьювантов для стимуляции поствакцинального иммунитета.

Нами проведено изучение стимулирующих свойств препаратов цитокинов на экспериментальной модели животных, с индуцированной циклофосфаном иммуносупрессией, при иммунизации вакциной против гепатита В («Энджерикс», фирма «GlaxoSmithKline», Бельгия). Исследования проведены на мышах линии Balb/c с использованием различных доз указанной вакцины (0,83 и 0,27 мкг/мышь). В качестве иммуноадьювантов исполь-

зованы препараты рекомбинантных цитокинов человека – «Беталейкин» (рчIL-1 β) и «Ронколейкин» (рчIL-2).

Влияние препаратов цитокинов на интенсивность иммунного ответа при иммунизации вакциной против гепатита В оценивали по числу сероположительных животных и уровню специфических АТ к HBsAg. Оценку проводили в динамике – через 15 дней после первой иммунизации и 15 дней после реиммунизации.

При иммунизации животных АГ (доза 0,83 и 0,27 мкг/мышь) в сочетании с рчIL-1 β уровень сероконверсии на 15-й день составил 42 и 35%. Указанные показатели были в 1,6 и 1,3 раза выше показателей контрольной группы животных, иммунизированных одним АГ. При иммунизации животных АГ в сочетании с рчIL-2 уровень сероконверсии составил 39 и 31%, что в 1,4 и 1,2 раза выше уровня контроля. После реиммунизации серонегативных животных АГ в сочетании с рчIL-1 β сероконверсия отмечена у 100% животных. Реиммунизация АГ на фоне введения рчIL-2 привела к сероконверсии в 85 и 100% случаев соответственно двум дозам АГ.

Анализ частоты выявления и уровня титров специфических АТ на 15-й день эксперимента показал, что при иммунизации животных АГ на фоне введения цитокинов АТ в титре от 20 до 100 мМЕ/мл были в 1,6-2,4 раза выше по сравнению с группой животных, иммунизированных одним АГ. Перед реиммунизацией животные были разделены на серопозитивную и серонегативную группы. Животным серопозитивной группы вводили один АГ, серонегативной группы – АГ или АГ в сочетании с цитокинами.

На 30-й день эксперимента в группе серопозитивных животных, иммунизированных с рчIL-1 β , после реиммунизации АГ отмечено появление АТ с более высоким титром (выше 100 мМЕ/мл), частота выявления которых составила 44 и 20%, в группе животных, иммунизированных с рчIL-2 – 21 и 15% соответственно двум дозам АГ. В контрольной группе животных, иммунизированных без цитокинов, уровень титров АТ выше 100 мМЕ/мл составлял 17% при дозе АГ 0,83 мкг/мышь. При дозе 0,27 мкг/мышь АТ с указанным титром не выявлялись.

В группе серонегативных животных, реиммунизированных АГ в сочетании с цитокинами, отмечен как более высокий средний уровень специфических АТ, так и большая частота встречаемости АТ с максимальным титром выше 100 мМЕ/мл по сравнению с контрольной группой. При реиммунизации АГ (доза 0,83 мкг) на фоне введения рчIL-1 β средний уровень АТ составлял $288 \pm 74,5$ мМЕ/мл, рчIL-2 – $464 \pm 138,0$ мМЕ/мл, тогда как в группе животных, реиммунизированных одним АГ – 143 ± 11 мМЕ/мл. При этом частота выявления АТ с титром выше 100 мМЕ/мл в группе с рчIL-1 β была выше в 5 раз, рчIL-2 – в 1,7 раза по сравнению с контролем. При реиммунизации животных АГ (доза 0,27 мкг) в сочетании с рчIL-1 β средний уровень титров АТ составлял $192 \pm 31,2$ мМЕ/мл, в контрольной группе животных, реиммунизированных одним АГ, титры АТ были ниже 100 мМЕ/мл и находились в пределах от 20 до 100 мМЕ/мл ($33 \pm 5,4$ мМЕ/мл). В группе животных, иммунизированных и реиммунизированных АГ с рчIL-2, средний уровень титров АТ составлял $190 \pm 35,0$ мМЕ/мл, в контроле – $113 \pm 11,5$ мМЕ/мл. Частота выявления АТ была в 2,3 раза выше по сравнению с группой животных, реиммунизированных одним АГ.

Результаты проведенных исследований свидетельствуют о том, что у животных с индуцированной циклофосфаном иммуносупрессией при первичной иммунизации АГ с цитокинами или реиммунизации на фоне введения цитокинов наблюдается более выраженный иммунный ответ по сравнению с животными, иммунизированными без цитокинов. Отмечен более высокий уровень сероконверсии, более высокий средний титр специфических АТ, а также большая частота встречаемости высоких титров АТ.

МЕХАНИЗМЫ НАРУШЕНИЯ МЕТАБОЛИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ НЕЙТРОФИЛОВ ПРИ РАЗЛИЧНЫХ ВИДАХ ГИПОКСИЧЕСКИХ СОСТОЯНИЙ

Николаев С.Б., Быстрова Н.А., Конопля А.И., Нетьяга Р.А.

ГОУ ВПО Курский государственный медицинский университет Росздрава, г. Курск, Россия

Основной причиной нарушения метаболизма клеток при многих патологических состояниях является гипоксия. Независимо от вида гипоксии в основе характерных для нее нарушений лежит снижение интенсивности процессов окисления и окислительного фосфорилирования. Наряду с принципиально общими механизмами развития иммуносупрессии при состояниях, характеризующихся выраженным стрессорным компонентом, имеют место характерные для них особенности, обусловленные природой индуцирующего агента, первичным звеном его воздействия на клетки и организм в целом. Общность направленности и в значительной степени выраженность иммунных сдвигов, наблюдающихся при различных формах стресса и патологии, сочетается с неодинаковой эффективностью корригирующего действия различных фармакологических средств, что диктует необходимость изучения механизмов возникающих нарушений.

Цель работы: исследовать механизмы нарушения кислородзависимой бактерицидной активности нейтрофилов при различных видах гипоксических состояний.

Материалы и методы. Исследования выполнены на крысах Wistar обоего пола массой 180-220 г. Для воспроизведения интервальной гипоксической гипоксии (ГипГ) крыс помещали в гермокамеры объемом 5 л до появления признаков терминальной стадии гипоксии с интервалом в 24 часа в течение 5 дней. Острую гемическую гипоксию (ОГГ) вызывали у крыс по Sapirstein однократной кровопотерей 1,5% массы тела животного. Тканевую гипоксию (ТГ) моделировали пятикратным внутрибрюшинным введением нитропрусида натрия в дозе 1 мг/кг

веса с интервалом в 24 часа. Через 120 часов после введения животных в эксперимент у них фотометрически оценивали метаболическую активность нейтрофилов периферической крови по показателям НСТ-теста в спонтанной реакции (НСТ сп.), стимулированной неопсонизированным зимозаном (НСТ стим. нз) и опсонизированным зимозаном (НСТ стим. оз), вычисляли коэффициенты, характеризующие функциональный резерв КАН = НСТ стим. нз / НСТ сп.; КАо = НСТ стим. оз / НСТ сп. и способность клеток к дискретному ответу – коэффициент опсонизации (КО = НСТ стим. оз / НСТ стим. нз).

Основные результаты. При всех видах гипоксических состояний достоверно уменьшается метаболическая активность нейтрофилов, как спонтанная, так и стимулированная. При этом оказалось, что при гипоксической гипоксии НСТ стим. оз снижается на 12% больше, чем НСТ стим. нз, достоверно уменьшается КАо и не изменяется КАН. Таким образом, менее энергоемкий для клетки процесс поглощения опсонизированного зимозана происходит с меньшей скоростью, чем поглощение неопсонизированного зимозана, что может свидетельствовать о конкурентном ингибировании рецепторного аппарата нейтрофилов на фоне гипоксической гипоксии иммуносупрессирующими субстанциями, появляющимися в крови. При тканевой гипоксии наоборот максимально по отношению к контролю снижается показатель НСТ стим. нз (на 36%) по сравнению с НСТ стим. оз (на 21%), достоверно уменьшается КАН и не изменяется КАо, что свидетельствует о преобладании энергетической составляющей в нарушении функции нейтрофилов, что объясняется специфическим действием нитропрусида натрия на терминальное звено цепи переноса электронов в митохондриях клеток, в том числе и иммунокомпетентных. Соответственно, при ГипГ КО уменьшается, а при тканевой возрастает. Гемическая гипоксия характеризуется сбалансированным значительным снижением показателей НСТ стим. нз и оз и соответствующих коэффициентов функционального резерва нейтрофилов, за исключением КО, который значимо не изменяется.

Заключение. Таким образом, среди механизмов нарушения метаболической активности нейтрофилов при различных видах гипоксических состояний важную роль играют дефицит энергообеспечения иммунокомпетентных клеток и конкурентное ингибирование их рецепторного аппарата иммуносупрессирующими субстанциями. При этом вклад каждого из этих двух компонентов в развитие иммуносупрессии при гипоксической, гемической и тканевой гипоксии различен.

ТАБЛИЦА (К ТЕЗИСАМ НИКОЛАЕВА С.Б. И ДР.)

Вид гипоксии	Показатели					
	НСТ сп., mOD	НСТ стим. нз, mOD	НСТ стим. оз, mOD	КАН	КАо	КО
Контроль	0,84±0,03	1,35±0,05	1,66±0,06	1,63±0,06	1,99±0,08	1,23±0,05
ГипГ	0,74±0,03*	1,19±0,04*	1,26±0,04*	1,62±0,07	1,71±0,06*	1,07±0,035*
ОГГ	0,71±0,02*	1,01±0,03*	1,19±0,04*	1,42±0,05*	1,68±0,06*	1,19±0,045
ТГ	0,68±0,02*	0,87±0,02*	1,31±0,05*	1,29±0,04*	1,92±0,06	1,51±0,075*

Примечание. * – $p < 0,05$ по отношению к группе интактных животных; mOD – единицы оптической плотности.

ЛЕПТИН КАК ВОЗМОЖНЫЙ ФАКТОР РЕГУЛЯЦИИ ИММУНИТЕТА ПРИ ФИЗИОЛОГИЧЕСКИ ПРОТЕКАЮЩЕЙ БЕРЕМЕННОСТИ

Орлова Е.Г., Ширшев С.В.

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

Лептин является пептидным гормоном, регулирующим энергетический обмен и накопление жировой ткани, метаболизм которой тесно взаимосвязан с реализацией репродуктивной функции. Уровень лептина значительно нарастает во время беременности. Лептин является провоспалительным гормоном и способствует преобладанию клеточно-опосредованного иммунного ответа. Беременность смещает акцент иммунных реакций на Th-2 путь иммунного реагирования, поэтому исследование роли лептина в контроле функциональной активности мононуклеарных лейкоцитов при беременности особенно актуально.

Цель работы: исследовать влияние лептина в дозах, сопоставимых с концентрацией гормона в I и во II-III триместрах беременности, на экспрессию функционально значимых мембранных молекул и продукцию цитокинов мононуклеарными лейкоцитами женщин в моделях *in vitro*.

Материалы и методы. В работе использовали фракционированную суспензию мононуклеарных клеток периферической крови здоровых небеременных женщин репродуктивного возраста, которую забирали в фолликулярную фазу менструального цикла. Мононуклеарные клетки получали центрифугированием в градиенте плотности фиколл-верографана. Гормон в культуры вносили в дозах 10 и 35 нг/мл, которые отражают его концентрацию в I и во II-III триместрах беременности соответственно. После 24 ч инкубации с гормоном супернатанты собирали, а клетки отмывали и оценивали фенотип методом проточной цитометрии. Жизнеспособность клеток после суточной инкубации с гормоном, определяемая в тесте с эозином, составляла 95-98 %. В супернатантах культур оценивали концентрацию наиболее значимых цитокинов (TNF α , IL-6, TNF α , IL-2, IL-4, IL-10) иммуноферментным методом. Статистический анализ результатов проводили с использованием парного t-критерия Стьюдента и корреляции Спирмена.

Основные результаты. Установлено, что лептин усиливает экспрессию активационной молекулы HLA-DR на T-лимфоцитах, не влияя при этом на экспрессию корцепторных мембранных молекул CD4 и CD8 на T-клетках и общее содержание T-лимфоцитов. Известно, что увеличение активированных HLA-DR⁺ T-лимфоцитов коррелирует с развитием реакций иммунного отторжения. Не исключено, что при беременности лептин усиливает активацию T-клеток и может стимулировать цитотоксические реакции. Увеличение экспрессии HLA-DR на T-лимфоцитах может быть обусловлено как непосредственным взаимодействием гормона с клеткой, так и опосредовано действием провоспалительных цитокинов, продукция которых усиливается лептином. Так, в исследуемых дозах гормон стимулирует выработку провоспалительных цитокинов TNF α и IL-6 и не влияет на секрецию IL-2, IL-4 и IL-10 мононуклеарными лейкоцитами. Помимо этого, в дозе, характерной для I триместра беременности, гормон повышает продукцию TNF α . Таким образом, при беременности лептин выступает провоспалительным фактором, стимулирующим секрецию Th-1-цитокинов. Известно, что избыточная продук-

ция цитокинов воспаления индуцирует цитотоксические реакции иммунной системы матери против аллогенных клеток плода. Однако при физиологически протекающей беременности Th-1-цитокины необходимы для успешной имплантации, способствуют инвазивному росту синцитиотрофобласта, участвуя в ремоделировании тканей. Таким образом, лептин, стимулируя секрецию Th-1-цитокинов, по-видимому, участвует в поддержании баланса про- и противовоспалительных цитокинов, что особенно важно на ранних этапах гестации и объясняет необходимость лептина для успешной имплантации. При исследовании модуляции лептином функциональной активности NK-клеток установлено, что гормон в концентрации, характерной для I триместра, повышает процент CD16⁺56⁺NK-клеток, что коррелирует с увеличением продукции TNF α мононуклеарными лейкоцитами. Тогда как в дозе, характерной для II-III триместров беременности, лептин, напротив, снижает содержание CD16⁺56⁺NK-клеток. Анализируя полученные результаты, следует отметить, что NK-клетки с фенотипом CD16⁺56⁺ являются наиболее зрелыми и обладают наибольшей цитолитической активностью. Можно полагать, что эффекты гормона направлены на изменение экспрессии молекулы CD16 на CD56⁺NK-клетках, что ассоциировано с регуляцией их цитотоксического потенциала. Причем модулирующее действие лептина, возможно, опосредовано активацией продукции TNF α мононуклеарными фагоцитами. При анализе регуляции лептином функциональной активности CD16⁺CD56⁺NKT-клеток установлено, что в дозе, характерной для I триместра беременности, гормон не влияет, а дозе, сопоставимой с его уровнем во II-III триместрах, увеличивает процент NKT-клеток, экспрессирующих CD16 и CD56. Выявленная положительная корреляция между увеличением CD16⁺CD56⁺NKT-клеток и повышением концентрации Th-1-цитокинов TNF α и TNF α , свидетельствует о возможной реализации эффектов гормона на NKT-клетки путем индукции синтеза вышеупомянутых цитокинов. Увеличение процента CD16⁺CD56⁺NKT-клеток под действием лептина в поздние сроки гестации, можно рассматривать как индукцию гормоном созревания NKT-клеток, поскольку формирование такого фенотипа является терминальной стадией их активации и ассоциировано с приобретением наибольшей цитотоксической активности. В целом полученные данные свидетельствуют о том, что лептин при беременности непосредственно действует на клетки-мишени на посттрансляционном уровне и/или путем усиления продукции Th-1-цитокинов активует T-лимфоциты и способствует фенотипическому созреванию NK- и NKT-клеток, что ассоциировано с усилением их цитотоксической активности. Таким образом, во время беременности лептин является иммунорегуляторным фактором, эффективно контролирующим экспрессию мембранных молекул и продукцию цитокинов мононуклеарными лейкоцитами.

НЕРЕШЕННЫЕ ПРОБЛЕМЫ СОВРЕМЕННОЙ ИММУНОЛОГИИ

Полевщиков А.В.

НИИ экспериментальной медицины СЗО РАМН, Санкт-Петербург, Россия

Несмотря на длительный период времени, прошедший с момента выделения иммунологии в самостоятельную медико-биологическую дисциплину и огромный

прогресс в изучении основных закономерностей функционирования иммунной системы, ряд концептуальных вопросов иммунологической теории остается весьма далеким от разрешения. Однако без беспристрастного анализа существующих проблем иммунологической теории дальнейший прогресс иммунологии как науки представляется маловероятным. Косвенным свидетельством реальности данной проблемы является отсутствие общепризнанной теории иммунитета, частая смена концепций механизмов регуляции иммунного ответа, несоответствие значительной части клинических наблюдений существующим теориям и, как результат, симптоматический, но не патогенетический характер иммуноотропной терапии в клинической иммунологии и аллергологии, отсутствие лекарственных препаратов, реально влияющих на реакции приобретенного иммунитета, низкий авторитет данных иммунологического обследования у клиницистов. Фактически основные достижения современной иммунологии (уничтожение оспы, создание современных подходов к профилактике многих других опасных инфекций) по-прежнему основаны на феномене иммунологической памяти, гениально описанном Л. Пастером по результатам серии экспериментов, проведенных в 1880-х годах.

Вероятно, в настоящее время иммунологическому сообществу следует признать, что до сих пор отсутствует общепринятое определение явления иммунитета. Если за основу определения принять явления антигенной специфичности и иммунологической памяти, то под такое определение совершенно не подпадают механизмы врожденного иммунитета, равно как и существование аутореактивных клонов Т-лимфоцитов и аутоантител. Если определение иммунитета основывать на так называемом поддержании антигенного гомеостаза, то тогда следует очерчивать область действия этой системы, поскольку понятие гомеостаза применяется лишь для уровня всего организма, в то время как система приобретенного иммунитета не охватывает целый ряд так называемых забарьерных органов.

Не меньше проблем оставляют и современные представления о функционировании тимуса – центрального органа иммунной системы. Особенно это касается одного из краеугольных камней функции тимуса – механизмов позитивной и негативной селекции. Если механизмы позитивной селекции, в ходе которых происходит определение сродства ТсR к молекулам МНС-I или МНС-II, что обеспечивает формирование CD8⁺ или CD4⁺Т-клеток соответственно, еще можно представить, то механизмы негативной селекции, в ходе которых должен индуцироваться апоптоз аутореактивных клонов, представляются чрезвычайно маловероятным событием, ибо в этом случае в тимусе должны быть сосредоточены все аутоантигены. Против этой гипотезы также действует и появление аутореактивных Т-клеток на периферии, равно как и экспериментальная недоказанность гибели не менее 95% созревающих Т-клеток в тимусе путем апоптоза, уровень которого редко в действительности превышает 20-25% от общего числа клеток. Самостоятельной нерешенной проблемой остается давно известное явление акцидентальной трансформации тимуса, в ходе которой на периферию выбрасываются именно незрелые Т-клетки, а дифференцированные Т-лимфоциты остаются в медулярной зоне тимической дольки. Биологический смысл этого явления остается совершенно неясным.

Другой пласт вопросов касается сроков подключения механизмов врожденного и приобретенного иммунитета

в ответ на проникновение антигена во внутреннюю среду. Общеизвестно, что механизмы врожденного иммунитета развивают ответную реакцию немедленно после проникновения антигена, в то время как ответ системы приобретенного иммунитета становится детектируемым с существенной временной задержкой, измеряемой даже у млекопитающих сроком в 3-6 суток после проникновения антигена. Помимо того, что такая задержка в подключении самой эффективной системы может быть летальной для организма в случае особо опасных инфекций, нельзя не обратить внимания на тот факт, что по данным сравнительной иммунологии этот факт не является случайностью, ибо у других позвоночных животных срок ответа системы приобретенного иммунитета составляет от 10 до 180 суток, что ставит под сомнение защитный характер эффектов системы приобретенного иммунитета.

Эти и другие факты требуют кардинального пересмотра наших представлений о функциях систем врожденного и приобретенного иммунитета.

Работа поддержана грантом РФФИ № 07-04-00084.

ПРОТИВОВОСПАЛИТЕЛЬНЫЕ И ИММУНОМОДУЛИРУЮЩИЕ СВОЙСТВА ПРЕПАРАТА «ЛЮРОМАРИН» ПРИ ОКИСЛИТЕЛЬНОМ СТРЕССЕ

Попов А.М., Артюков А.А., Кривошапко О.Н., Петровичева С.Е., Цыбульский А.В., Козловская Э.П.

Тихоокеанский институт биоорганической химии ДВО РАН, г. Владивосток, Россия

Рациональной тактикой при окислительном стрессе, который всегда сопровождается избыточным выбросом провоспалительных медиаторов, является обратимое подавление чрезмерной секреторной функции моноцитов/макрофагов. При этом предпочтение следует отдавать препаратам, обладающим, помимо иммуномодулирующего, противовоспалительным и антиоксидантным эффектом. К таким агентам относятся полигидроксилированный фенол розмариновая кислота (РК) и флавоноид лютеолин (ЛТ), которые имеют широкое распространение среди пищевых и лекарственных растений. Их основные фармакологические эффекты связаны с высокой антиоксидантной и противовоспалительной активностью, а также с модуляцией функциональной активности иммунокомпетентных клеток. Важно подчеркнуть, что РК и ЛТ хорошо абсорбируются кожей и всасываются из желудочно-кишечного тракта в кровь. Нами определен новый природный источник выделения РК и ЛТ, разработана технология получения на их основе комбинированного препарата, получившего название «Люромарин» (ЛМ), и изучены его иммуномодулирующие свойства.

Показано, что при окислительном стрессе, вызываемом разными индукторами *in vitro* (перекись водорода, гидроксил-анион) и *in vivo* (тетрахлорметан, аллоксан), ЛМ эффективно защищает клетки и ткани печени, поджелудочной железы и иммунной системы, в частности, антиген-представляющие клетки, от токсических доз активных форм кислорода и значительно уменьшает уровень в плазме крови таких провоспалительных цитокинов, как фактор некроза опухоли- α , интерферон- α и интерлейкины-1 и 6.

ЛМ как сильный противовоспалительный агент в достаточно низких дозах (1-10 мг/кг) проявляет выраженную

ингибирующую активность в отношении продукции оксида азота NO – важного провоспалительного фактора, и резко снижает продукцию провоспалительных лейкотриенов в человеческих полиморфоядерных лейкоцитах *in vitro*.

ЛМ обладает ингибирующей активностью на моделях *in vivo*. Так, ЛМ (10 мг/кг, в.м.) уменьшает отек лапы у мышей, а в дозе 5-50 мг/кг *per os* снижает пассивную кожную анафилаксию. Пероральное введение ЛМ (10 и 50 мг/кг) эффективно супрессирует отек лапы, индуцированный инъекцией каррагинана, уменьшает отек уха у мышей, вызванный арахидоновой кислотой или оксазолоном. ЛМ обладает более сильным противовоспалительным и иммуномодулирующим эффектом, чем РК и ЛТ, применяемые отдельно в том же дозовом диапазоне.

Таким образом, комбинированный препарат ЛМ повышает устойчивость к воздействию окислительного стресса при развитии воспалительных и иммунологических реакций. Поэтому ЛМ можно рекомендовать в качестве эффективного противовоспалительного средства и иммунокорректора при развитии патологических процессов, вызванных окислительным стрессом.

ВЛИЯНИЕ НОВЫХ ПРОИЗВОДНЫХ ГИДРОКСИНИКОТИНОВОЙ КИСЛОТЫ И 3-ГИДРОКСИПИРИДИНА НА ФУНКЦИОНАЛЬНУЮ АКТИВНОСТЬ НЕЙТРОФИЛОВ КРЫС

Рагулина В.А., Авдеева Е.В., Орлова Е.А., Стабровская Н.В.

Курский государственный медицинский университет, г. Курск, Россия

В последние годы пристальное внимание фармакологов и клиницистов в качестве перспективных лекарственных средств, эффективно регулирующих процессы окисления и перекисидации, привлекли производные 3-гидроксипиридина (3-ГП) и гидроксиникотиновой кислоты (ГНК). Данные соединения относятся к простейшим гетероциклическим аналогам ароматических фенолов и в этой связи проявляют антиоксидантные, антирадикальные и мембраностабилизирующие свойства [Самойлов Н.Н., 2002; Смирнов Л.Д., 2003; Ясенцов В.В., Смирнов Л.Д., 2005]. Вместе с тем влияние данных соединений на формирование иммунного ответа мало исследовано, не изучены механизмы иммунокорректирующего действия производных ГНК и 3-ГП в условиях нормы и патологии.

Целью настоящего исследования было изучение влияния нового производного ГНК (лабораторный шифр ХС-2) и производного 3-ГП («Этоксидол») синтезированных в ВНИЦ БАВ на функциональную активность нейтрофилов.

Исследования проведены на 32 крысах Вистар массой 120-180 г. Для получения статистически достоверных результатов группы формировали из 8 животных. Животных выводили из опыта декапитацией под эфирным наркозом. Для исследования от опытных животных получали нейтрофилы периферической крови. Соединения вводили пятикратно (интервал 24 ч), внутривентриально, ХС-2 в дозе 100 мг/кг, «Этоксидол» в дозе 50 мг/кг. В качестве препарата сравнения использовали структурный предшественник оксиникотиновой кислоты – производное оксипиридина с выраженными антиоксидантными свойствами – «Мексидол», который вводили внутривентриально, в дозе 30 мг/кг, по той же схеме, что и исследуемые вещества.

Функциональную активность нейтрофилов оценивали в тесте восстановления нитросинего тетразолия (НСТ). Учет результатов НСТ-теста проводили фотометрически [Зинкин В.Ю., Годков М.А., 2004]. Влияние производных ГНК и 3-ГП на фагоцитарную активность нейтрофилов периферической крови оценивали по фагоцитарному показателю, фагоцитарному числу и индексу активности фагоцитоза [Медведев А.Н., Чаленко В.В., 1991]. Кислородзависимую активность нейтрофилов определяли по спонтанному и стимулированному тестам восстановления нитросинего тетразолия. Резервы функциональной активности клеток оценивали по коэффициентам активации с опсонизированным и неопсонизированным зимозаном. Степень дискретности клеточной активности на различные стимулы определяли по коэффициенту опсонизации [Виксман М.Е., Маянский А.Н., 1979; Щербаков В.И., 1989].

Результаты проведенных исследований показывают, что применение соединения ХС-2 и «Этоксидола» достоверно увеличивало поглотительную активность и кислородзависимый метаболизм нейтрофилов периферической крови, а их активность была равна активности «Мексидола». Так, применение соединения ХС-2 увеличивало показатель ФЧ в 1,23 раза к контролю, «Этоксидола» – в 1,3 раза к контролю. Соединения ХС-2 и этоксидол по влиянию на спонтанную активность нейтрофилов проявляли равную активность с «Мексидолом». По влиянию на показатели НСТ н/з и НСТ о/з данные соединения были более активны, чем «Мексидол».

Таким образом, установлено выраженное стимулирующее действие, сравнимое с действием «Мексидола», у новых производных ГНК и 3-ГП на показатели фагоцитарной и метаболической активности полинуклеаров периферической крови крыс.

ВЛИЯНИЕ «АФОБАЗОЛА» НА ЭКСПРЕССИЮ РАННИХ АКТИВАЦИОННЫХ АНТИГЕНОВ НА Т-ЛИМФОЦИТАХ

Разумная Ф.Г., Садовников С.В., Сибиряк С.В.

Институт биохимии и генетики Уфимского научного центра РАН, г. Уфа, Россия

«Афобазол» (5-этокси-2-[2-(морфолино)-этилтио]) бензимидазола дигидрохлорид) разработан в НИИ фармакологии РАН им. В.В. Закусова и является селективным анксиолитиком, обладающим нейропротекторным эффектом. Подавляющее большинство 2-замещенных производных бензимидазола проявляет выраженную иммуностимулирующую активность. Данные об этом аспекте действия афобазола пока отсутствуют, что определяет актуальность изысканий в данном направлении.

Целью работы явилась оценка характера влияния афобазола на экспрессию ранних активационных антигенов на Т-лимфоцитах.

Объектом исследования явились мононуклеары периферической крови здоровых доноров. Клетки инкубировали 2 ч (экспрессия CD69) или 24 ч (экспрессия CD25) (среда RPMI-1640, 10% FBS, 50 мкг/мл гентамицина, 37 °С, 5% CO₂) в присутствии 10 мкг/мл ФГА-Р (индуцированная экспрессия) или без фитолектина (спонтанная экспрессия). «Афобазол» (субстанция любезно предоставлена академиком С.Б. Середениным) вносили в культуру в концентрациях 0,1 мкг/мл, 10 мкг/мл и 100 мкг/мл. По окончании инкубации производили иммунофенотипирование (CD3FITC/CD25PE/CD4PC5, гейтирование

по CD3) и проточную цитометрию (Cytomix FC 500, Beckman Coulter).

Результаты исследования иллюстрирует таблица «Афобазол» не изменял спонтанной экспрессии α -цепи IL-2 (CD25) на Т-лимфоцитах, но в диапазоне концентраций от 10 до 100 мкг/мл снижал индуцированную митогеном экспрессию CD25 на CD3⁺Т-лимфоцитах и CD3⁺CD4⁺Т-хелперах. Препарат вызывал дозозависимую гиперэкспрессию антигена CD69 на нестимулированных CD3⁺Т-лимфоцитах во всем диапазоне концентраций, а на CD3⁺CD4⁺ лимфоцитах в концентрациях 10 и 100 мкг/мл. При использовании минимальной концентрации отмечалась статистически значимая гиперэкспрессия CD69 на CD4 негативной популяции (в основном ЦТЛ) (данные не представлены). «Афобазол» значимо не изменял индуцированную ФГА-Р экспрессию CD69, уменьшая, таким образом, индекс активации. Сигнальные системы, сопряженные с антигеном CD69 (VEA), рассматриваемые некоторыми авторами как рецептор врожденного иммунитета, играют двойственную роль в функционировании Т-клеток (и индукция пролиферации, и индукция апоптоза или анергии). Можно предположить, что афобазол воздействует на внутриклеточные мишени, ранняя индукция которых приводит к падению «ответственности» Т-лимфоцитов на активацию. Причем, судя по полученным результатам, CD3⁺CD4⁺Т-хелперы менее чувствительны к воздействию низких концентраций препарата.

ПРОТЕКТИВНЫЙ ИММУНИТЕТ К *Mycobacterium tuberculosis*, ИНДУЦИРОВАННЫЙ ВВЕДЕНИЕМ ВАКЦИНЫ BCG PER OS НОВОРОЖДЕННЫМ МЫШАМ

Рубакова Э.И., Кондратьева Т.К., Кондратьева Е.В., Капина М.А., Шепелькова Г.С., Майоров К.Б., Апт А.С.

ЦНИИ туберкулеза РАМН, Москва, Россия

Вакцинация против туберкулеза остается крайне актуальной проблемой в связи с тяжестью заболевания, его распространением как в развитых, так и развивающихся

странах, увеличением риска инфицирования различных популяций населения и особенно для людей с ВИЧ-инфекцией.

Изучение неонатальной вакцинации особенно важно в связи с чувствительностью новорожденных к вирулентным внутриклеточным возбудителям, в том числе и к возбудителям туберкулеза. Единственной эффективной и доступной вакциной против туберкулеза остается вакцина BCG. В настоящее время применяется внутрикожный способ введения вакцины, однако в связи с массовостью проведения вакцинации необходимы исследования безыгольных методов введения BCG.

Целью нашей работы является исследование возможности вакцинации BCG новорожденных мышей. Мы сравнили эффективность подкожного и орального способа вакцинации BCG новорожденных мышей при экспериментальном туберкулезе.

Новорожденным мышам линии C57BL/6 на 9-й день после рождения вводили вакцину BCG. Через 3 месяца после вакцинации животных заражали интратрахеально вирулентными микобактериями туберкулеза (штамм H37Rv). Эффективность вакцинации оценивали по уровню бактериальной нагрузки в органах и продолжительности жизни зараженных мышей.

Было установлено, что как подкожная вакцинация BCG, так и вакцинация *per os* приводила к индукции протективного противотуберкулезного иммунитета. В легких и селезенке животных наблюдалось уменьшение количества микобактерий. Анализ клеточных популяций в легких вакцинированных животных выявил уменьшение числа нейтрофилов, увеличение числа макрофагов и В-клеток по сравнению с контрольными невакцинированными животными. Вакцинированные и невакцинированные животные отличались также по выработке цитокинов.

При сравнении продолжительности жизни мышей после оральной или подкожной вакцинации установлено, что продолжительность жизни обеих вакцинированных групп была значительно увеличена по сравнению с контрольными зараженными животными.

ТАБЛИЦА (К ТЕЗИСАМ РАЗУМНОЙ Ф.Г. И ДР.)

Условия культивирования			Относительное содержание клеток % $m \pm s d$ (n = 6)				
ФГА	Афобазол, мкг/мл			CD3 ⁺ CD25 ⁺	CD4 ⁺ CD25 ⁺	CD3 ⁺ CD69 ⁺	CD4 ⁺ CD69 ⁺
	0,1	10,0	100,0				
				3,0 \pm 1,5	2,2 \pm 1,6	4,2 \pm 2,1	1,3 \pm 0,4
	+			3,0 \pm 1,5	2,0 \pm 1,3	5,3 \pm 2,9*	1,5 \pm 0,6
		+		2,8 \pm 0,8	2,0 \pm 0,9	7,5 \pm 2,4*	2,2 \pm 0,5*
			+	2,2 \pm 1,7	2,1 \pm 1,7	18,9 \pm 2,3*	9,8 \pm 2,6*
+				40,9 \pm 7,7	29,6 \pm 4,1	40,1 \pm 8,9	17,1 \pm 3,4
	+			42,0 \pm 7,6	31,3 \pm 3,8	44,0 \pm 10,0	22,1 \pm 7,6
		+		31,9 \pm 14,8*	20,2 \pm 10,2*	43,0 \pm 9,3	22,1 \pm 8,2
			+	24,9 \pm 9,0*	16,6 \pm 8,8*	35,6 \pm 5,2	18,4 \pm 2,0

Примечание. * – различия с контрольными культурами статистически значимы ($p < 0,05$), критерий Стьюдента для сопряженных пар признаков.

Таким образом, в настоящей работе показана эффективность вакцинации VCG *per os* новорожденных мышей (в отличие от взрослых животных), сопоставимая с подкожной вакцинацией.

ОСОБЕННОСТИ ЭКСПРЕССИИ ГЕНА ГОМОЛОГА С3 КОМПОНЕНТА КАСКАДА КОМПЛЕМЕНТА РАЗЛИЧНЫМИ ФРАКЦИЯМИ ЦЕЛОМОЦИТОВ МОРСКОЙ ЗВЕЗДЫ *ASTERIAS RUBENS*

Сафина Д.А., Могиленко Д.А., Кудрявцев И.В.,
Сухачев А.Н., Полевщиков А.В.
ГУ НИИ экспериментальной медицины РАМН,
Санкт-Петербург, Россия

Центральным компонентом каскада комплемента у всех представителей вторичноротых животных является С3. Основным источником С3 в организме позвоночных животных служат гепатоциты печени, способные в течение первых 24 часов после запуска воспалительной реакции повышать концентрацию данной молекулы в сыроворотке крови в 2-3 раза, что позволяет рассматривать С3 в качестве позитивного реактанта острой фазы. Тканевые макрофаги также обладают способностью к экспрессии и синтезу С3, причем на интервале 8-24 часа после проникновения патогена уровень экспрессии генов С3, равно как и продукция белка, возрастают в 50-80 раз. У вторичноротых беспозвоночных (на примере иглокожих и оболочников) основным источником гомологов С3 являются циркулирующие фагоциты (амебоциты), а в случае морских звезд еще и клетки аналога печени – гепатопанкреас. В ходе серии экспериментов *in vivo* нами была предпринята попытка произвести количественное определение уровня экспрессии С3 в различных клеточных фракциях морской звезды *A. rubens*. В ходе предварительных исследований нами был клонирован и секвенирован фрагмент гомолога С3 у *A. rubens* (ArC3-like, GenBank ABG81854). В качестве стимулятора для исследований *in vivo* использовали ЛПС *S. typhimurium* (1 мг/мл на животное), контролем служило введение равного объема изотонического раствора в целомическую полость. При помощи центрифугирования в градиенте плотности диатризоата натрия получали три фракции целомоцитов: первая фракция формировалась на интерфазе целомическая жидкость – 10% (до 95% малых амебоцитов), вторая – интерфаза 10 и 12,5% (73-80% агранулярных амебоцитов) и третья – интерфаза 12,5-15% диатризоата натрия (75-85% гранулярных амебоцитов). Тотальную РНК выделяли с использованием реагента STAT-60 («TEL-TEST») в соответствии с инструкциями изготовителя, реакцию обратной транскрипции проводили с использованием dT16 праймера. Количественный RT-PCR проводили с использованием праймеров к гену глицеральдегидфосфатдегидрогеназы (GPDHG) *A. rubens* и к гену ArC3-like (прямой 5'-GGNTGYGGNGARCARACNATG-3' и обратный 5'-RRANGCNGTNRCCANGTRCT-3'), технология SyberGreen. Полученные значения выражали как отношения уровня экспрессии ArC3-like к уровню экспрессии GPDHG, принимая за 100%-й уровень, полученный для клеток 1 фракции контрольной группы. Было показано, что через 12 часов после введения ЛПС морской звезде в первой фракции уровень экспрессии ArC3-like возрос в 34,6 раза по сравнению с контролем. Для второй фракции эта величина составила в среднем 5,4 раза, тогда как в клетках третьей фракции имело место значительное

(почти 20-кратное) снижение уровня синтеза мРНК С3. Полученные данные позволяют предполагать, что основным источником С3 у морской звезды являются малые и агранулярные амебоциты. Гранулярные амебоциты не обладают выраженной синтетической активностью.

Работа поддержана грантами РФФИ № 07-04-00084 и 08-04-00111.

РОЛЬ P53 И NFκB В РЕАЛИЗАЦИИ IL-2-ОПОСРЕДОВАННОГО АПОПТОЗА ЛИМФОЦИТОВ

Сазонова Е.В., Чечина О.Е., Биктасова А.К.,
Жукова О.Б., Лосенков И.С., Рязанцева Н.В.,
Новицкий В.В.

ГОУ ВПО «Сибирский государственный медицинский университет», г. Томск, Россия

Процесс программированной клеточной гибели в настоящее время рассматривается в качестве ключевого механизма регулирования иммунных реакций. IL-2, являясь фактором, определяющим жизнедеятельность иммунокомпетентных клеток, обладает двойственным влиянием на реализацию танатогенной программы [Hildeman D.A. et al., 2002]. Между тем вопрос относительно молекулярных мишеней, задействованных в передаче сигнала, опосредованного данным медиатором, остается открытым. В связи с этим целью настоящего исследования явилось изучение роли белков P53 и NFκB в реализации IL-2-опосредованного апоптоза лимфоцитов.

В эксперименте *in vitro* использовали лимфоциты крови, полученные у 12 здоровых доноров (5 мужчин и 7 женщин в возрасте 22-30 лет). Выделенные на градиенте плотности Ficoll-Paque («Pharmacia», Швеция) клетки культивировали в течение 18 ч при 37 °C и 5% CO₂ в чистой среде RPMI-1640 («Вектор-Бест», Новосибирск) либо в среде с добавлением рекомбинантной формы IL-2 (rIL-2) («Invitrogen», США) в дозе 0,1 нг/мл. Исследование реализации апоптоза лимфоцитов осуществляли с помощью проточной цитометрии в аннексиновом тесте с добавлением пропидиум йодида («Beckman Coulter», США). Для оценки содержания транскрипционных факторов NFκB и P53 применялся метод вестерн-иммуоблоттинга. Статистическую обработку результатов проводили с использованием непараметрического критерия Манна-Уитни.

При культивировании *in vitro* лимфоцитов с добавлением rIL-2 было зарегистрировано достоверное повышение уровня апоптоза относительно интактной культуры, сопровождающееся увеличением уровня транскрипционного фактора NFκB, что свидетельствует о его заинтересованности в проведении опосредованного IL-2 апоптотического сигнала. В то же время в исследуемой культуре отмечалось достоверное снижение содержания нефосфорилированного P53. Выявленный факт может указывать на избыточное накопление активной фосфорформы данного белка, задействованной в реализации клеточной гибели.

Таким образом, в результате проведенного нами исследования установлено, что IL-2 способен оказывать проапоптотический эффект в отношении лимфоцитов, реализуемый при участии транскрипционного фактора NFκB и P53.

ИНГИБИТОРНОЕ ДЕЙСТВИЕ 2-ЗАМЕЩЕННЫХ БЕНЗИМИДАЗОЛА НА МИТОГЕНЕЗ ЛИМФОЦИТОВ СОПРЯЖЕНО С АНР-ЗАВИСИМЫМИ МЕХАНИЗМАМИ

Сибиряк Е.С.¹, Садовников С.В.¹, Сибиряк С.В.^{1,2}

¹Институт биохимии и генетики Уфимского научного центра РАН, г. Уфа, Россия

²Институт иммунологии и физиологии УрО РАН, г. Екатеринбург, Россия

В последние годы вновь возрос интерес к иммуотропным свойствам 2-замещенных производных бензимидазола. Это связано с обнаружением способности некоторых соединений этого класса прицельно воздействовать на механизмы активации и процессы линейной дифференцировки CD4⁺Т-лимфоцитов. Многие бензимидазолы являются агонистами арилуглеводородного рецептора (AhR) – лиганд-активируемого транскрипционного фактора, контролирующего деление и дифференцировку клеток, апоптоз, транскрипцию генов ферментов биотрансформации эндо- и ксенобиотиков, генов цитокинов и факторов роста и как показали недавние исследования, транскрипцию гена Foxp3.

Целью работы явилась оценка характера комбинированного действия бензимидазола, имеющего серу в положении 2-азольного гетероцикла и высокоселективного лиганда AhR 2,3,7,8-тетрахлордibenzo-p-диоксина (ТХДД), на митогенный ответ Т-лимфоцитов периферической крови здоровых доноров при их стимуляции анти-CD3 МКА (клон IСO-90, 2 мкг/мл). ТХДД и анализируемые соединения, 5-этокси-2-[2-(морфолино)-этилтио]бензимидазол («Афобазол»), 2-тиетанилбензимидазол («Тиетазол»), 2-этилтиобензимидазол («Бемитил») вносили в культуру одновременно с митогеном (концентрации соединений представлены в таблице). Митогенез оценивали с помощью Alamar blue Assay (Biosource), для анализа характера взаимодействия использована модель «независимости» Блисса (Bliss independence).

ТАБЛИЦА (К ТЕЗИСАМ СИБИРЯК Е.С. И ДР.)

Условия культивирования	% подавления митогенеза, в сравнении с контролем, M±SD	«Независимость» Блисса	
		теоретически рассчитанный аддитивный эффект, %	характер взаимодействия
ТХДД 10 nM	22±16		
«Афобазол» 0,1 мкг/мл	60±17		
ТХДД + «Афобазол»	44±14	68±17*	антагонизм
ТХДД 10 nM	8±1		
«Тиетазол» 0,1 мкг/мл	14±14		
ТХДД + «Тиетазол»	10±9	18±14*	антагонизм
ТХДД 10 nM	7±2		
«Бемитил» 0,01 мкг/мл	3±3		
ТХДД + «Бемитил»	2±2	10±4*	антагонизм

Примечание. * – различия с экспериментально выявленным % ингибиции статистически значимы (p < 0,05), критерий Стьюдента для сопряженных пар признаков.

Из таблицы видно, что как все изученные 2-замещенные производные бензимидазола подавляли митогенез Т-лимфоцитов (эффективные концентрации определены в предварительных экспериментах). ТХДД также ингибировал митогенез, что, как известно, связано с подавлением лиганд-связанной формой AhR транскрипционной активности NF-κB. Все изученные производные бензимидазола характеризовались антагонистическим характером взаимодействия с ТХДД, что свидетельствует об участии AhR-зависимых механизмов в реализации их влияния на функциональную активность Т-лимфоцитов.

ВЛИЯНИЕ VEGF НА АДГЕЗИЮ И МИГРАЦИОННУЮ АКТИВНОСТЬ ТИМОЦИТОВ МЫШЕЙ ПРИ ОПУХОЛЕВОМ РОСТЕ

Тендлер Е., Каплан М., Паншин А.

Медицинский центр «Рамбаб», г. Хайфа, Израиль

Макрофаги – наиболее важная группа подвижных долгоживущих клеток способных к фагоцитозу. Они играют важную роль в генерации иммунного ответа, осуществляя процессинг антигенов и презентацию антигенных эпитопов в комплексе с антигенами гистосовместимости 2-го типа. Известна способность макрофагов к образованию различной формы выростов, называемых в англоязычной литературе по-разному (veils, protuberances, protrusions, lamellipodia, filopodia). Посредством этих образований клетки осуществляют прямой контакт друг с другом. Нами были изучены человеческие макрофаги полученные из human monocytic leukaemia cell line, моноцитов линии THP-1 после стимуляции 10 nM phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) в течение 72 часов. При окраске препаратов пропидиумом и ДАПИ эти выросты окрашиваются резко положительно, с той же интенсивностью, что и ядра этих же клеток. Окраска пропидиумом и ДАПИ специфична для нуклеиновых кислот, как для ДНК, так и для РНК. После обработки препаратов РНКазой

окраска выростов существенно уменьшается, ДНКазы не влияют на окрашивание. При исследовании этой культуры при помощи Time Lapse Microscope в течение 48-72 ч можно видеть, как выросты одних клеток внедряются в цитоплазму других и как по ним продвигаются округлые образования, по форме напоминающие бисер. Такие же структуры выявляются и при исследовании на конфокальном микроскопе. Можно предположить, что этот механизм связан с прямой передачей генетической информации от клетки к клетке.

АКТИВАЦИЯ МАКРОФАГОВ ЛИЗОСОМОТРОПНЫМИ ПОЛИСАХАРИДАМИ

Ткачев В.О., Троицкий А.В., Архипов С.А., Лузгина Н.Г., Шкурупий В.А.

Научный центр Клинической и экспериментальной медицины СО РАМН, г. Новосибирск, Россия

Декстраны, представляющие собой линейные либо слаборазветвленные полисахариды бактериального происхождения и состоящие из остатков глюкозы, соединенных альфа-гликозидными связями, эффективно поглощаются клетками системы мононуклеарных фагоцитов и накапливаются в их вакуолярном аппарате. Химическое либо радиационное окисление молекул декстрана приводит к образованию химически активных альдегидных групп, что позволяет присоединять к ним различные низкомолекулярные лиганды и использовать их для целенаправленной доставки лекарственных соединений в клетки системы мононуклеарных фагоцитов. Немодифицированные и окисленные декстраны не являются биологически инертными соединениями. Показано, что эндоцитоз молекул декстрана сопровождается изменением функциональных особенностей макрофагов, однако до настоящего времени механизм их действия до конца не выяснен.

Целью данной работы было изучение особенностей активации перитонеальных макрофагов мышей окисленными химическим способом декстранов с молекулярной массой 35 и 60 кДа (OxDex-35 и OxDex-60), основываясь на особенностях метаболизма L-аргинина и экспрессии CD14 и CD16/32.

Материалы и методы. Продукцию оксида азота оценивали по содержанию нитритов в супернатантах двухсуточных клеточных культур макрофагов, используя реактив Грисса.

Активности аргиназы определяли по скорости образования мочевины из экзогенного L-аргинина с использованием α -изонитрозопропиофенона.

Экспрессию маркеров CD14 и CD16/32 оценивали при помощи моноклональных антител (Pharmingen, USA) на проточном цитометре FACSCalibur с помощью программы CellQuest.

Основные результаты. В условиях *in vitro* окисленные декстраны значительно ингибируют активность макрофагальной аргиназы и являются слабыми активаторами NO-синтазы (способность стимулировать продукцию NO зависит от молекулярной массы полисахарида и его концентрации).

В условиях *in vivo* окисленные декстраны являются мощными активаторами макрофагальной NO-синтазы

(причем OxDex-35 является более эффективным по сравнению с OxDex-60), при этом максимум продукции оксида азота наблюдали спустя 24 ч после введения исследуемых полисахаридов. Также установлено, что OxDex-35 на активность макрофагальной аргиназы *in vivo* не влияет, тогда как OxDex-60 более чем в трикратно увеличивает ее спустя 48 часов после введения препарата.

Неактивированные резидентные перитонеальные макрофаги характеризуются низким уровнем экспрессии CD14 (CD14^{low}), и большая часть из них конститутивно экспрессирует CD16/32. Окисленные декстраны вне зависимости от их молекулярной массы *in vivo* увеличивают экспрессию CD14 на макрофагах и не влияют на экспрессию CD16/32.

Заключение. Таким образом, лизосомотропные полисахариды *in vivo* и *in vitro* изменяют функциональное состояние клеток системы мононуклеарных фагоцитов, которые при этом приобретают «провоспалительный» фенотип классически активированных макрофагов (сMФ, или M1-клеток), характеризующихся усилением цитотоксических и бактерицидных свойств.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ЭКСПРЕССИИ CD69 НА ЛИМФОЦИТАХ МЫШЕЙ, ИММУНИЗИРОВАННЫХ ПРОТИВ ЧУМЫ В ОТВЕТ НА СТИМУЛЦИЮ АНТИГЕНАМИ ЧУМНОГО МИКРОБА

Фирстова В.В., Бахтеева И.В., Титарева Г.М., Зырина Е.В., Иванов С.А., Анисимов А.П.

ФГУН ГНЦ Прикладной микробиологии и биотехнологии, г. Оболensk, Россия

Введение. До настоящего времени не разработаны методы, оценивающие *in vitro* напряженность специфического поствакцинального противочумного иммунитета. Выявление экспрессии поверхностных маркеров лимфоцитов – один из методов оценки их эффекторной функции. CD69-антиген – маркер ранней активации – появляется на поверхности антиген- или аллергенспецифически активированных *in vitro* лимфоцитов.

Цель и задачи: определить экспрессию раннего маркера активации CD69 на лимфоцитах после их стимуляции *in vitro* F1- и V-антигенами чумного микроба и выявить специфичность этой активации.

Материалы и методы. Мышей линии BALB/c (5 групп) иммунизировали двукратно подкожно физиологическим раствором (1), гидроксидом алюминия (2), V-антигеном *Y. pestis* (3), F1 *Y. pestis* (4), и смесью антигенов F1 и V (5). На 28-е сутки иммуногенеза спленоциты (5×10^5 кл./мл) каждой группы мышей инкубировали 24 ч при 37°C, во влажной атмосфере, 5% CO₂ в присутствии F1- и V-антигена (1 и 10 мкг/мл). В качестве положительного контроля служили лимфоциты, активированные ConA, в качестве отрицательного – лимфоциты без стимуляции *in vitro*. По окончании инкубирования спленоциты окрашивали моноклональными антителами к поверхностным маркерам CD3 PerCP (BD Biosciences Pharmingen), CD4 APC, CD8 PE, CD69 FITC (Caltag, Invitrogen). Анализ проводили на проточном цитофлуориметре FACSCalibur (Becton Dickinson). Процент клеток, несущих маркер CD69, определяли с помощью трехцветного цитометрического анализа и программы

«Cell Quest». Группы мышей заражали штаммом *Y. pestis* 231. Определяли LD50.

Результаты. Достоверных различий в процентном содержании CD3⁺CD4⁺ и CD3⁺CD8⁺ лимфоцитов в разных группах мышей не обнаружили.

Определяли процентное количество лимфоцитов в пяти группах экспериментальных животных CD3⁺CD4⁺, несущих на своей поверхности маркер ранней активации CD69. На лимфоцитах интактных и иммунизированных мышей выявили небольшой процент CD3⁺CD4⁺CD69⁺ клеток (3,68%) через 24 ч инкубирования в среде DMEM. Спонтанную стимуляцию лимфоцитов наблюдали в культурах спленоцитов, выделенных от мышей, иммунизированных V-антигеном чумного микроба (22,92%).

Исследовали активацию лимфоцитов разных групп мышей антигенами чумного микроба *in vitro*. Максимальная величина LD50 (22241 КОЕ) коррелировала с достоверным увеличением активированных лимфоцитов (60,69%) в группе мышей, иммунизированных смесью F1- и V-антигенов чумного микроба в ответ на стимуляцию лимфоцитов *in vitro* F1 (10 мкг/мл).

Заключение. Определение экспрессии раннего маркера активации в CD3⁺CD4⁺ субпопуляции лимфоцитов в ответ на стимуляцию *in vitro* F1-антигеном, вероятно, может применяться для оценки напряженности поствакцинального специфического иммунного ответа.

ПЕРСПЕКТИВЫ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ЛПС AZOSPIRILLUM LIPOFERUM SP59B И A. BRASILENSE SP245 В КАЧЕСТВЕ МОДУЛЯТОРОВ ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ ФАГОЦИТОВ

Фомина А.А.¹, Суркина А.К.¹, Бойко А.С.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 большое внимание уделяется поиску новых природных иммуностимулирующих веществ, среди которых перспективны липополисахариды (ЛПС) грамотрицательных бактерий, в силу большого разнообразия их строения и свойств. В медицинской практике уже применяются такие препараты как пирогенал, продигозан, сальмозан, значительно повышающие устойчивость макроорганизма к бактериальным и вирусным инфекциям. Однако многие ЛПС обладают высокой токсичностью и пирогенностью, что ограничивает их использование в качестве индукторов неспецифического иммунитета, показателем эффективности которого является фагоцитарная активность и функционально-метаболическое состояние макрофагов. В связи с этим целью данного исследования было оценить токсичность ЛПС диазотрофных ризобактерий из группы микроорганизмов, стимулирующих развитие растений *Azospirillum lipoferum* Sp59b (ЛПС_{Sp59b}) и *A. brasilense* Sp245 (ЛПС_{Sp245}) и их влияние *in vitro* на активность и завершенность фагоцитоза бактерий, индукцию метаболитов кислорода и азота мышьями лейкоцитами.

Токсичность ЛПС исследовали постановкой биопробы на *Colpoda steinii*. Оценку проводили качественно, учитывая наличие погибших инфузорий, а также характер, скорость движения и степень повреждения оболочек клеток. Острую токсичность ЛПС определяли при одно-

кратном внутрибрюшинном введении нелинейным белым мышам весом 18-21 г, предварительно сенсибилизированным 3,2% D-галактозамингидрохлоридом. Спленоциты и перитонеальные макрофаги (ПМФ) выделяли из организма мышей стандартными методиками. Макрофаги использовали для моделирования *in vitro* фагоцитоза *Escherichia coli* Ca 53. Непосредственно перед внесением бактерий в инкубационные пробирки добавляли в концентрации 1 мкг/мл ЛПС азоспиррилл и коммерческий продигозан в качестве препарата сравнения. Активность фагоцитоза бактерий определяли через 1, 2, 4, 6 и 24 ч, рассчитывая фагоцитарные индексы (ФИ) и индексы завершенности фагоцитоза (ИЗФ). Интенсивность продукции NO спленоцитами определяли методом Грисса по накоплению в инкубационной среде ионов NO₂⁻. Продукцию активных форм кислорода (АФК) макрофагами определяли в спектрофотометрическом варианте теста восстановления нитросинего тетразолия (НСТ-тест) при 640 нм. Активность миелопероксидазы в лизате ПМФ оценивали спектрофотометрически при 490 нм.

В результате постановки биопробы на инфузориях показано, что после внесения ЛПС_{Sp245} и ЛПС_{Sp59b} в дозе 10 мкг/мл уже через 5 и 10 мин соответственно инфузории замедляли движение и приобрели шаровидную форму, а через 30-35 мин возвращались к норме. При изучении острой токсичности ЛПС_{Sp245} и ЛПС_{Sp59b} на мышах определена LD50, которая составила 5,6 и 8,9 мкг соответственно, что было практически в 30 раз больше по сравнению с действием классического эндотоксина ЛПС *E. coli* 055:B5, что свидетельствовало о невысокой токсичности препаратов.

Показано, что наибольшим активирующим воздействием на процесс фагоцитоза обладал ЛПС_{Sp59b}. Добавление его в культуру фагоцитов приводило к значительному увеличению ФИ (на 25-29 % по сравнению с контролем) в интервале 1-4 ч фагоцитоза. К 6 и 24 ч процесса значения ФИ соответствовали контрольным. В присутствии ЛПС_{Sp245} динамика фагоцитоза эшерихий была сходной с таковой для ЛПС_{Sp59b}. ЛПС_{Sp245} увеличивал ФИ на 11, 27 и 22% к 1, 2 и 4 ч процесса фагоцитоза по сравнению с контролем соответственно. Препараты показали фагоцитарную активность сравнимую с эффектом продигозана, кроме того, на начальном этапе фагоцитоза к 1 ч ЛПС_{Sp59b} активировал на 12 % большее количество макрофагов.

На основе фагоцитарных индексов были рассчитаны индексы завершенности фагоцитоза эшерихий макрофагами. Для ЛПС азоспиррилл эти индексы имели положительные значения, как и в контроле. Полученные значения характеризовали процесс фагоцитоза *E. coli* Ca 53 при добавлении ЛПС_{Sp245} и ЛПС_{Sp59b} как частично завершенный.

Активация спленоцитов мышей ЛПС азоспиррилл приводила к дозозависимому синтезу NO. В диапазоне 0,01-1 мкг/мл ЛПС_{Sp59b} и ЛПС_{Sp245} продукция NO возрастала в 1,2-1,6 раза по сравнению с контролем. В дозе 1 мкг/мл препараты индуцировали синтез NO на уровне эффекта продигозана. Оксид азота является показателем активности индуцибельной NO-синтазы (iNOS) и необходим клеткам макроорганизма в качестве цитотоксического и противовоспалительного агента. Полученные данные свидетельствуют о способности ЛПС азоспиррилл стимулировать в спленоцитах синтез iNOS как важнейшего микробицидного фактора.

Результаты постановки НСТ-теста показали, что продукция АФК макрофагами, индуцированная ЛПС_{Sp245} и ЛПС_{Sp59b} достоверно не отличалась от контроля. Выраженного дозозависимого эффекта действия ЛПС азоспирилл на активность МПО отмечено не было, опытные значения незначительно увеличивались в 1,1-1,3 раза по сравнению с контролем.

Таким образом, под влиянием ЛПС_{Sp245} и ЛПС_{Sp59b} выявлено увеличение числа активных макрофагов на стадии адгезии, образования фаголизосомы, а также киллинга эшерихий. Кроме того, ЛПС азоспирилл активизировали функционально-метаболические процессы внутри лейкоцитов – нитрогенные и частично оксидазные, но не связанные с НАДФ-оксидазной системой клеток, способные обеспечить их микробицидные свойства. В связи с этим перспективно дальнейшее изучение ЛПС_{Sp245} и ЛПС_{Sp59b} в связи с их биодоступностью и невысокой токсичностью в плане возможного использования в медико-биологической практике.

ВЛИЯНИЕ ЭНДОГЕННЫХ И ЭКЗОГЕННЫХ ФАКТОРОВ НА ФУНКЦИИ ЭНДОТЕЛИАЛЬНЫХ КЛЕТОК

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

ГУ НИИ экспериментальной медицины РАМН, Санкт-Петербург, Россия

В последние годы эндотелиальные клетки (ЭК) прочно заняли позиции одного из важнейших факторов врожденного иммунитета, чем определяется возрастающее внимание к изучению возможностей целенаправленной регуляции функций этих клеток. В задачи исследования входила проверка чувствительности ЭК человека перевиваемой линии EA.Hy926 к действию различных эндогенных и экзогенных биологически активных агентов. Прежде всего, было изучено влияние на свойства ЭК ростовых факторов. В нашей модели ростовые факторы VEGF и FGFb слабо стимулировали пролиферацию ЭК, а VEGF стимулировал и их миграционную активность. С использованием той же экспериментальной модели было исследовано влияние ряда цитокинов на свойства ЭК. Показано, что провоспалительные цитокины (IL-8, IL-1 β) оказывали активирующее действие на пролиферацию ЭК, TNF α стимулировал миграцию ЭК, в то время как IFN α проявил ингибирующую активность в отношении пролиферации и миграции ЭК. TNF α не только достоверно усиливал спонтанную секрецию IL-8 и MCP-1, но и индуцировал дополнительно секрецию еще одного хемокина – RANTES. IFN γ и IL-4 не влияли на секрецию хемокинов ЭК. Уровень спонтанной секреции IL-6 в присутствии TNF α повышался в семь раз. IFN γ и IL-4 не оказывали влияния на секрецию IL-6. Провоспалительные цитокины TNF α и IFN γ стимулировали конститутивную экспрессию адгезионных молекул ICAM-1 и VCAM-1 на ЭК EA.Hy926. В отличие от них противовоспалительный цитокин IL-4 ингибировал экспрессию молекулы ICAM-1 на клетках EA.Hy926. Конститутивная экспрессия молекул главного комплекса гистосовместимости I класса на клетках EA.Hy926 возрастала под влиянием провоспалительных цитокинов TNF α , IFN γ . Наиболее выраженное стимулирующее действие на экспрессию молекул HLA-A, B, C оказывал IFN γ . При использовании сочетания цитокинов TNF α проявил способность усиливать стимулирующие эффекты IFN γ . Как видно из приведенных результатов, большинство провоспалительных

цитокинов активировали пролиферацию ЭК, их миграционную и секреторную активность, экспрессию на ЭК адгезионных молекул. Исключение составили отдельные ингибирующие эффекты IL-4 и IFN α . Полученные данные позволяют предположить, что цитокины играют важную роль среди эндогенных регуляторов функций ЭК, обеспечивая их вовлечение в процессы воспаления. В лечебной практике в качестве одного из НПВС используется целекоксиб – специфический ингибитор циклооксигеназы-2 (COX-2), которая индуцируется в ответ на воспалительный процесс. Противовоспалительное действие препарата осуществляется за счет блокирования продукции воспалительных простаноидов посредством ингибирования COX-2. Мы изучили влияние целекоксиба на функции ЭК линии EA.Hy926. Было обнаружено статистически достоверное снижение пролиферации ЭК при использовании целекоксиба в концентрациях 10, 1 и 0,1 мкг/мл. Целекоксиб ингибировал миграцию ЭК в одинаковой степени при использовании его в концентрациях от 1 до 10 мкг/мл. Ранее в другой экспериментальной системе нами было показано, что цитокин TNF α способен существенно повышать миграционную активность эндотелиальных клеток. Мы использовали TNF α в качестве универсального активатора свойств эндотелиальных клеток, способного индуцировать усиленную миграцию ЭК. Наши исследования показали, что и в данной экспериментальной модели под влиянием TNF α происходило усиление интенсивности миграции эндотелиальных клеток линии EA.Hy926. Целекоксиб дозозависимо ингибировали индуцированную под влиянием TNF α миграцию эндотелиальных клеток. Мы моделировали *in vitro* ситуацию, сходную с воспалением, изучая влияние целекоксиба на миграционную активность ЭК, активированных цитокином TNF α , и убедились в том, что и в таких условиях целекоксиб эффективно тормозил процесс миграции ЭК. На основании полученных результатов мы пришли к заключению, что ЭК могут служить мишенями ингибирующего действия экзогенного противовоспалительного препарата.

ИММУНОХИМИЧЕСКАЯ ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ СИСТЕМА ГОМЕОСТАЗА И НЕСПЕЦИФИЧЕСКИЙ РЕАКТИВНЫЙ ГЕПАТИТ

Цейликман О.Б.¹, Цейликман В.Э.²

¹Южно-Уральский государственный университет, г. Челябинск, Россия

²Челябинская государственная медицинская академия, г. Челябинск, Россия

Концепция И.Е. Ковалева [Ковалёв И.Е., Мусабаев Э.И., Ахмедова М.Д., 1994] об иммунно-химической функциональной системе гомеостаза раскрывает основные закономерности, обуславливающие взаимодействия между иммунной и микросомальной системой цитохрома P450 (CYP450s) в печени. Главной функцией иммунной и монооксигеназных систем, в конечном счете, считается поддержание химического гомеостаза в организме. Обе системы взаимодействуют с широким кругом химических соединений, и при этом происходит индукция соответствующих изоформ CYP450s или антител и рецепторов [Ковалев И.Е., Nebert D., 1989]. Между активностью монооксигеназной системы печени и системы иммуно-биологического надзора существует определенная взаимосвязь. В настоящее время показано, что

реципрокные отношения между иммунной и монооксигеназными системами опосредуются провоспалительными цитокинами [Сибиряк С.В. и соавт., 2006]. Нами установлено, что стрессорные воздействия, сопровождающиеся провоспалительными изменениями в печени (по данным морфологии, неспецифический реактивный гепатит), характеризуются повышенной чувствительностью к IL-1. Так, у нестрессированных животных при введении rIL-1 β (6,5 мкг/кг; препарат любезно предоставлен профессором А.С. Симбирцевым) наблюдалось трехкратное снижение уровня CYP1A1-зависимой ЭРОД активности при одновременном уменьшении на 50% CYP2B1/2-зависимой БРОД-активности. Но в группе «стресс + IL-1 β » наблюдалось более выраженное (по сравнению с группой «IL-1 β ») угнетение активности этих цитохром Р450-зависимых монооксигеназ. Так, в группе «стресс + IL-1» по сравнению с группой «IL-1» уровень ЭРОД активности снизился в 2,5 раза при одновременном уменьшении на 22% БРОД-активности. У нестрессированных животных одновременно с развитием цитокинзависимой супрессии печеночных монооксигеназ наблюдалась активация ПОЛ. Так, у животных группы «IL-1» на 28% повышено содержание гептанрастворимых (цитоплазматическая фракция продуктов ПОЛ) диеновых конъюгатов. В группе «стресс + IL-1» по сравнению с группой «IL-1» достоверно повысился уровень диеновых конъюгатов в гептановой фазе. Однако при этом наблюдалось снижение содержания изопропанолрастворимых диеновых конъюгатов. Также установлено, что у стрессированных животных наблюдалось увеличение интенсивности реакции ГЗТ, что свидетельствует о стимуляции клеточного звена иммунитета. Полученный результат также свидетельствует о постстрессорном повышении чувствительности к флогогенным факторам, так как реакцию ГЗТ принято рассматривать как проявление иммуновоспалительного процесса.

Исследования выполнены благодаря финансовой поддержке гранта Президента РФ для молодых докторов наук (МД-2063.2008.7).

ЭКСПРЕССИЯ ГЕНОВ ИНТЕРФЕРОНОВ (IFN) В УСЛОВИЯХ ИНДУКЦИИ БЕЛКАМИ ГАММА-ГЛОБУЛИНОВОЙ ФРАКЦИИ ПЛАЗМЫ КРОВИ И ВЗАИМОДЕЙСТВУЮЩИМИ С НИМИ КАТИОНАМИ МЕТАЛЛОВ

Чекнёв С.Б., Мезенцева М.В., Шаповал И.М., Наровлянский А.Н.

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

В основе взаимосвязей системы IFN с белками γ -глобулиновой фракции плазмы крови, реализуемых через семейство Fc рецепторов (FcR), лежат транскрипционные механизмы. IFN γ вызывает в клетках накопление мРНК Fc γ RI, Fc γ RII и Fc γ RIII. Связывание Fc γ RIII с Fc фрагментом IgG индуцирует транскрипцию генов IFN γ и интерлейкина-2, синергично Fc γ RIII повышающего в клетках уровень мРНК IFN γ . Конформационные преобразования Fc фрагментов антител за счет присоединения катионов металлов приводят к изменению выработки IFN α и IFN γ .

Целью работы явилась оценка синтеза мРНК IFN α и IFN γ в мононуклеарных клетках (МНК) в присутствии

катионов меди и цинка, а также модифицированных ими белков γ -глобулиновой фракции плазмы крови.

Материалы и методы. Определение мРНК IFN α и IFN γ в МНК периферической крови 8 здоровых доноров проводили с использованием обратной транскрипции (ОТ) и полимеразной цепной реакции (ПЦР). Образцы модифицированного связыванием меди и цинка человеческого сывороточного γ -глобулина (ICN) применяли 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, связавшегося с белком. Контрольными индукторами выработки IFN служили ридостин и циклоферон. Исследуемые образцы вносили в десятикратно разведенные средой Игла (с солями Эрла) пробы лейкомаксы доноров и инкубировали в течение 24 час при 37 °С в CO $_2$ -инкубаторе (Flow). По истечении срока инкубации из клеточной фракции выделяли МНК в одноступенчатом градиенте плотности Ficoll-Paque (Pharmacia). Выделение суммарной РНК проводили методом кислой гуанидин тиоцианат-фенол-хлороформной экстракции. Полученную РНК, обработанную ДНКазой (Promega), использовали в качестве матрицы для проведения реакции ОТ с использованием случайных гексамеров и MMLV обратной транскриптазы (Promega). ПЦР со специфическими праймерами для IFN α и IFN γ (Синтол) проводили на амплификаторе «Терцик» (ДНК-технология). Результаты учитывали электрофорезом в геле 1,0% агарозы (Lonza) с окрашиванием бромистым этидием (Appllichem).

Результаты. ОТ-ПЦР обнаруживает конститутивное присутствие мРНК IFN α в МНК всех обследованных доноров. Полуколичественный характер тестирования не позволяет зарегистрировать изменений, связанных с активацией клеток в условиях индукции исследуемыми образцами. В отличие от IFN α , мРНК IFN γ в МНК конститутивно не выявляется. В присутствии контрольных белков она обнаруживается более чем в 60% наблюдений. Катионы меди и цинка вызывают появление мРНК IFN γ в 25% случаев. Трансформированный цинком γ -глобулин в 60% наблюдений утрачивает способность индуцировать синтез мРНК IFN γ . Эффекты белка, модифицированного медью, подлежат воспроизведению.

Заключение. Белки γ -глобулиновой фракции, а также катионы металлов, индуцирующие выработку IFN γ , реализуют активность индукторов, изменяя экспрессию генов IFN в МНК. Связывание цинка γ -глобулином снижает эффекторный потенциал белка. Согласно данным независимых исследований, это приводит к снижению содержания IFN γ в пуле индуцируемого IFN и противовирусной активности образцов. Результат может рассматриваться в контексте ограничения избыточной продукции IFN γ на уровне физиологической иммунорегуляции.

«ИММУОВАК-ВП-4»: ПОЛЯРИЗАЦИЯ ИММУННОГО ОТВЕТА В ЗАВИСИМОСТИ ОТ МЕТОДА ВВЕДЕНИЯ

Чертов И.В., Ахматов Э.А., Егорова Н.Б., Ахматова Н.К.

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

В настоящее время расширился интерес к исследованию возможности регуляции врожденных иммунных механизмов при разных методах введения препаратов,

несущих в своем составе PAMPs микроорганизмов, определяющих набор PRRs и, соответственно, сигнальные пути дальнейших этапов развития иммунного ответа.

Цель: определение степени экспрессии TLRs клетками иммунокомпетентных органов (селезенка, лимфоидная ткань, ассоциированная с органами дыхания – BALT/NALT, слизистая оболочка кишечника – BALT), при разных методах введения «Иммуовак-ВП-4».

Оценку количества клеток, экспрессирующих TLRs, осуществляли методом проточной цитометрии с применением моноклональных антител (МКА) (Caltag Laboratories, США) против соответствующих антигенов. Изучение степени экспрессии TLRs (2,4,9) проведено на мышцах, вакцинированных 1- и 2-кратно с интервалом 2-3 суток подкожно (по 0,2 мг), интраназально (по 0,5 мг) и перорально (по 2 мг) поликомпонентной вакциной «Иммуовак-ВП-4».

Уровень экспрессии всех трех TLRs в исследованных органах (контроль) составил 0,01-0,5%. У мышей, вакцинированных 1-кратно интраназально, экспрессия исследованных TLRs существенно не увеличивалась. При пероральном однократном введении вакцины в дозе 2 мг было отмечено значительное увеличение TLR4 и TLR9 в лимфоидном аппарате кишечника до $5,2 \pm 0,5\%$ и $4,6 \pm 0,3\%$ соответственно, а также TLR9 до $1,2 \pm 0,3\%$ в лимфатических узлах, ассоциированных с органами дыхания. В селезенке существенных сдвигов при этом методе введения не было. При подкожном однократном введении отмечали значительное увеличение уровня TLR2 в селезенке ($3,4 \pm 0,3\%$) и TLR4 ($1,2 \pm 0,06\%$) и увеличение до $1 \pm 0,04\%$ - $1,59 \pm 0,06\%$ всех трех TLRs в BALT и NALT. Лимфоидный аппарат кишечника оставался интактным.

При 3-кратном введении экспрессия TLR4 увеличивалась в BALT/NALT до $1,43 \pm 0,09\%$. Экспрессия TLR9 увеличилась в BALT/NALT до $1,27 \pm 0,17\%$ и в GALT до $1,2 \pm 0,15\%$. При пероральном введении наибольшая экспрессия TLR4 и TLR9 выявлена в GALT до $13 \pm 1,62\%$ и $14,9 \pm 1,47\%$ соответственно. В NALT/BALT эти показатели составили $1,9 \pm 0,32$ и $2,95 \pm 0,65\%$. Обращает внимание на себя то, что содержание TLR9 увеличено и в селезенке до $3,47 \pm 0,9\%$.

При обоих непарентеральных методах введения практически не была выявлена существенная динамика TLR2 в исследованных органах. Иммунизация мышей подкожным методом имела несколько существенных отличий от непарентеральных методов. Во-первых, для этого метода оказалось характерным то, что экспрессия всех трех исследованных TLRs происходила в селезенке и в NALT/BALT, причем в последних даже в большей степени до $11,19 \pm 13,18\%$. Во-вторых, экспрессия всех трех рецепторов в слизистой оболочке кишечника была минимальной и лишь немного превышала показатели у интактных мышей. В-третьих, TLR2 в значительных количествах определялся только при подкожном введении. В данном исследовании один и тот же препарат «Иммуовак-ВП-4» вызывает различные сигнальные пути клеточной активации при разных методах введения: при подкожном введении увеличивается экспрессия TLR4, TLR9, TLR2, что обуславливает дальнейшую клеточную дифференцировку по Th-1 и, в определенной степени, по Th-2 пути; при неинвазивных методах экспрессия TLR4 и TLR9 предполагает дальнейшее развитие иммунитета по Th-1 пути, соответственно этому индукцию синтеза IFN γ , ингибирующего синтез IL-4 и дальнейшие пути развития атопии. Таким образом, можно полагать, что различная

степень сенсibilизации при разных путях введения одних и тех же препаратов предопределена уже на этапе взаимодействия лиганда с TLR. Так, при подкожном методе иммунизации лиганда «Иммуовак-ВП-4» индуцировали экспрессию всех трех исследованных TLRs, тогда как при неинвазивных методах этот же препарат вызывал значительное увеличение TLR4 и TLR9 при отсутствии динамики TLR2.

ДЕЙСТВИЕ БЕЛКА ТЕПЛООВОГО ШОКА НА ИММУНОГЕННУЮ АКТИВНОСТЬ КАПСУЛЬНОГО ПОЛИСАХАРИДА *HAEMOPHILUS INFLUENZAE* ТИПА В

Шевчик Ю.С., Новикова О.В., Ахматова Н.К., Свешников П.Г., Ястребова Н.Е., Курбатова Е.А.

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

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

Haemophilus influenzae типа b является причиной острых и хронических воспалительных заболеваний различной локализации прежде всего у детей младшего возраста. Для профилактики гемофильной инфекции в настоящее время используют вакцины, конъюгированные с белком-носителем. Конъюгация с белком является необходимым условием достижения эффективной вакцинации, так как полисахаридные антигены капсульных бактерий при введении в организм вызывают Т-независимый ответ без участия CD4⁺Т-хелперов. При этом не происходит переключения классов иммуноглобулинов, созревания аффинности антител и образования иммунологической памяти. В большинстве конъюгированных вакцин используют дифтерийный или столбнячный анатоксины. Такое ограниченное число белковых носителей предполагает, что увеличивающееся число конъюгированных вакцин содержащих одни и те же антигенные детерминанты анатоксинов может привести к конкуренции носитель – полисахарид и снижению специфического иммунного ответа на полисахарид. Поэтому поиск новых эффективных белков-носителей является актуальным.

Цель: изучение действия белка теплового шока на иммуногенную активность капсульного полисахарида *Haemophilus influenzae* типа b.

Материалы и методы. В работе использован капсульный полисахарид *H. influenzae* типа b (КПНib), полученный с помощью осаждения цетавлоном, рекомбинантный микобактериальный белок теплового шока с молекулярной массой 70 кДа (БТШ70). Иммунизацию мышей линии СВА проводили трехкратно КПНib с интервалом 14 суток в дозе 5 мкг. БТШ70 использовали в смеси или при конъюгации с КПНib в дозах 20 или 100 мкг по той же схеме. На 12-е сутки после последней иммунизации у мышей брали кровь и определяли в ИФА: титры антител к КПНib, к БТШ70, уровень аутоантител и цитокинов, а также исследовали изменение субпопуляций лимфоцитов селезенки методом проточной цитометрии.

Результаты. На 12-е сутки после иммунизации отмечено повышение титров антител к КПНib в сыворотке крови мышей иммунизированных КПНib и КПНib с БТШ70 во всех исследованных группах (ОП 1,3-1,4 против 0,7 у не иммунизированных мышей). Разницы в титрах антител к КПНib между исследуемыми группами выявить не удалось.

В группах иммунизированных смесью КПНiв с БТШ70 или конъюгированным с БТШ70 препаратом происходило повышение в 5,8-6,2 раза уровня антител к БТШ70. В контрольной группе и в группе, получавшей КПНiв, повышения титров антител к БТШ70 выявлено не было. Для решения вопроса о том взаимодействуют ли антитела к БТШ70 с общими антигенными эпитопами органов и тканей человека было проведено тестирование сывороток на содержание аутоантител методом ИФА. Исследование показало, что иммунизация КПНiв с БТШ70 не приводит к образованию аутоантител к органам и тканям человека у мышей при испытанных дозах и схемах иммунизации.

В субпопуляционном составе лимфоцитов после иммунизации КПНiв существенных изменений выявлено не было, тогда как при использовании КПНiв с БТШ70 в 2,8 раза повышалось содержание CD4⁺T-хелперов по сравнению с КПНiв, повышался уровень NKТ, CD19 и увеличивался уровень толл-подобных рецепторов TLR 2,4,9. Из всех тестируемых цитокинов (IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-6, TNF α , IL-10, IL-12p70, IFN γ , TGF β) в исследуемый срок происходило повышение только IL-6, но только в тех группах, которые получали КПНiв с БТШ70.

Заключение. Использование БТШ70 в комбинации с КПНiв вызывает выраженные иммунологические сдвиги в организме иммунизированных мышей. Повышение CD4⁺T-хелперов можно рассматривать как маркер T-зависимого иммунного ответа при иммунизации КПНiв с БТШ70.

МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ ИММУННОГО ОТВЕТА ЛЕГОЧНОЙ ТКАНИ НА ЭНТЕРАЛЬНОЕ ВВЕДЕНИЕ УГЛЯ И ТВЕРДЫХ ПРОДУКТОВ ЕГО СГОРАНИЯ

Шинкаренко Е.А., Савченко А.А., Зыкова Л.Д., Шинкаренко А.В.

НИИ медицинских проблем Севера СО РАМН, Красноярский государственный медицинский университет, г. Красноярск, Россия

Изучение иммунного ответа организма на воздействие производственных факторов в течение многих лет остается одной из важнейших научно-практических задач медицинской экологии. К наиболее частым санитарно-производственным факторам относится пыль, образующаяся при различных производственных процессах и вызывающая целый ряд профзаболеваний. В связи с этим представляет интерес изучение особенностей течения патологических процессов возникающих при пылевом воздействии.

Изучены структурные изменения лимфоидной ткани в легком мышей при энтеральном воздействии бурой каменноугольной пыли и твердых продуктов ее сгорания. Такой механизм поступления токсических веществ присутствует как при добыче, так и при переработке бурого угля, но долгое время он оставался практически не исследованным.

Целью нашей работы явилось изучение морфологических аспектов тканевого иммунитета в ответ на энтеральное поступление угля и твердых продуктов его сгорания.

Использован гумусовый, бурый уголь марки 2Б добываемый на Бородинском угольном месторождении, а также твердые вещества, образующиеся при его сгорании. В эксперименте были использованы 50 мышей-самцов

массой 25-28 г. Животные были разделены на группы: контрольную и четыре подопытные. Контрольная группа содержалась в течение всего эксперимента на стандартном рационе, животные опытных групп вместе с пищей ежедневно получали угольную пыль и твердые продукты сгорания угля. Доза вводимых веществ определялась из расчета 0,1 и 0,2 г угольной пыли на одно животное, в связи с изменением физических свойств угля при его сгорании доза вводимой золы была меньше – 0,25 и 0,5 г на одно подопытное животное. Наблюдения проводились в течение 11 недель. Эксперимент над животными проводили в соответствии с «Правилами проведения работы с использованием экспериментальных животных». Кусочки легкого фиксировались в 10% нейтральном формалине, парафиновые срезы окрашивались гематоксилином и эозином.

У мышей, получавших с рационом 0,1 г угля, на фоне мелкоочаговой метаплазии бронхиального эпителия определяются перибронхиальная пролиферация лимфоидной ткани. Инфильтраты представляют собой мелкоочаговые скопления лимфоцитов расположенные за пределами адвентиции бронхиолы. Альвеолярные мешочки расправлены, в альвеолярных септах и в просветах альвеол определяется небольшое количество альвеолярных макрофагов. При увеличении вводимой дозы угля до 0,2 г патологические изменения, выявленные у мышей первой группы минимальны: лишь у 30 % мышей перибронхиально определяются небольшие группы лимфоидных клеток, альвеолярные септы не изменены, просветы альвеол свободны.

У всех животных, получавших с рационом 0,25 г золы, в различной мере определяется ангиопатия, перивазальное формирование полиморфноклеточных инфильтратов от мелкоочаговых до обширных с формированием мощных перивазальных муфт. У 60 % животных данной группы часть артерий и артериол выявляется с неравномерно утолщенной стенкой за счет разрыхления мышечного слоя, гладкие миоциты гипертрофированы, перивазально расположены очаговые инфильтраты, состоящие из большого количества лимфоцитов с примесью гистиоцитов и единичных нейтрофильных лейкоцитов. Часто клеточный инфильтрат проникает в адвентицию и за ее пределы в мышечную пластинку. У остальных животных данной группы перивазальная лимфогистиоцитарная инфильтрация выражена в меньшей мере, сопровождается дегенеративными изменениями стенок артерии и вен. Также у 60% животных, получавших малую дозу золы, отмечается метаплазия и очаговая атрофия, десквамация бронхиального эпителия. Перибронхиально наблюдаются мелко и крупноочаговые лимфогистиоцитарные инфильтраты. В некоторых бронхолах воспалительный клеточный экссудат проникает во все слои вплоть до слизистой оболочки. Воздушность респираторного отдела сохранена, альвеолярные септы скудно инфильтрированы макрофагами. В легких мышей, получавших с рационом 0,5 г золы, признаков перибронхиальной пролиферации лимфоидной ткани не выявлено. Однако у 50 % животных мелкоочаговые лимфоидные гранулемы определяются в интерстиции респираторного отдела, часто с включениями угольного пигмента.

Таким образом, энтеральное введение малых доз угля и твердых продуктов его сгорания вызывает в легком активацию клеточного иммунитета. Проллиферация лимфоидной ткани осуществляется преимущественно перибронхиально, перивазально и ассоциирована

с патологическими изменениями бронхиальной и сосудистой стенки. При поступлении больших доз золы инфильтраты представлены в виде гранулем и располагаются в респираторном отделе легочной ткани.

БЕТА-АДРЕНЕРГИЧЕСКИЕ МЕХАНИЗМЫ РЕГУЛЯЦИИ ФУНКЦИЙ ИММУННОЙ СИСТЕМЫ ПРИ СТРЕССЕ

Шилов Д.Ю.¹, Шилов Ю.И.^{1,2}, Шилов С.Ю.², Юркова Е.В.²

¹ Пермская государственная медицинская академия им. акад. Е.А. Вагнера, г. Пермь, Россия

² Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН, г. Пермь, Россия

Катехоламины и глюкокортикоиды, являясь основными регуляторами адаптации, выступают как синергисты в регуляции функций иммунной системы, что может определяться, с одной стороны, индуцированными глюкокортикоидами изменениями экспрессии адренорецепторов и трансдукции с них сигнала, а с другой — модуляцией катехоламинами действия глюкокортикоидов на уровне трансактивации гормонсвязывающих рецепторов.

Цель работы: изучение участия адренергических механизмов в регуляции функций иммунной системы при стрессе.

Материалы и методы. Эксперимент выполнен на крысах-самцах популяции Wistar и белых нелинейных крысах-самцах. В исследованиях в системе *in vitro* использовали лейкоциты периферической крови практически здоровых мужчин-добровольцев в возрасте от 20 до 51 лет (средний возраст — 28 лет). Иммуномодулирующие эффекты блокады бета-адренорецепторов при введении гидрокортизона и остром стрессе (24-часовая иммобилизация в сочетании с дозированной кровопотерей) оценивали по изменению числа антителообразующих клеток в регионарном лимфатическом узле и степени выраженности реакции гиперчувствительности замедленного типа (ГЗТ) при подкожной иммунизации эритроцитами барана, а также фагоцитарной активности клеток регионарного лимфатического узла, лейкоцитов периферической крови и перитонеальных фагоцитов. Взаимодействие эффекта глюкокортикоидов и агонистов адренорецепторов в системе *in vitro* оценивали по включению ³H-тимидина в 72-часовых культурах с фитогемагглютинином-П (ФГА, Sigma, США в концентрациях 2,5; 5; 10; 20 и 40 мкг/мл). Статистический анализ результатов проводили с использованием апостериорного критерия Дункана (post-hoc Duncan's test) для множественного сравнения между группами, а также парного и непарного вариантов t-критерия Стьюдента.

Основные результаты. Установлено, что введение пропранолола гидрохлорида (4 инъекции по 5 мг/кг массы тела подкожно с интервалом 3 ч, 1-я инъекция — за 30 мин до введения гидрокортизона) значительно снижает степень выраженности супрессивного действия гидрокортизона ацетата (однократно внутривенно в дозе 50 мг/кг) в период индукции и в эффекторную фазу иммунного ответа на антителообразование в регионарном лимфатическом узле и развитие реакции ГЗТ. В эффекторную фазу иммунного ответа пропранолол отменяет индуцированные гидрокортизоном снижение относительных показателей фагоцитарной активности клеток регионарного лимфатического узла, развитие

нейтрофильного лейкоцитоза, моноцитоза, лимфопении, активацию нейтрофильного фагоцитоза, снижение фагоцитарной активности перитонеальных нейтрофильных гранулоцитов, мононуклеарных фагоцитов, тучных клеток. Блокада бета-адренорецепторов не отменяет индуцированное гидрокортизоном снижение числа ядродержащих клеток в тимусе, регионарном и отдаленном лимфатических узлах, селезенке, что указывает на независимость этих эффектов гормона от функциональной экспрессии бета-адренорецепторов. В условиях острого стресса регистрируется значительная супрессия реакции ГЗТ при отсутствии изменения числа антителообразующих клеток в регионарном лимфатическом узле. Введение бета-адреноблокатора пролонгированного действия соталола гидрохлорида (3 инъекции по 5 мг/кг массы тела внутривенно с интервалом 12 ч, 1-я инъекция — за 30 мин до начала иммобилизации) отменяет этот эффект. В системе *in vitro* агонист бета-адренорецепторов гексопреналина сульфат (10^{-6} М) усиливает супрессивное действие агониста глюкокортикоидных рецепторов II типа дексаметазона (10^{-7} М) на пролиферативный ответ лимфоцитов в культурах с ФГА.

Заключение. Полученные результаты указывают на важную роль индуцированного глюкокортикоидами изменения экспрессии бета-адренорецепторов и/или трансдукции с них сигнала в иммуномодулирующих эффектах стресса, что имеет существенное значение для изучения механизмов регуляции функций иммунной системы при адаптации.

Работа поддержана грантами РФФИ 08-04-00424-а и 08-04-00517-а, Программы Президиума РАН «Молекулярная и клеточная биология» и Интеграционного проекта УрО РАН совместно с СО РАН.

ИЗУЧЕНИЕ ВЛИЯНИЯ АГОНИСТА И АНТАГОНИСТА β -АДРЕНОРЕЦПТОРОВ НА ИММУННЫЙ ОТВЕТ И ФАГОЦИТАРНУЮ АКТИВНОСТЬ НЕЙТРОФИЛОВ И МОНОЦИТОВ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ ТИРЕОТОКСИКОЗЕ

Шилов Ю.И.^{1,2}, Годовалов А.П.²

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

² Пермская государственная медицинская академия им. акад. Е.А. Вагнера, г. Пермь, Россия

Цель работы. Исследование влияния агониста и антагониста β -адренорецепторов на иммунный ответ и фагоцитарную активность клеток периферической крови при экспериментальном тиреотоксикозе.

Материалы и методы. Эксперимент выполнен на 92 самцах белых крыс с исходной средней массой 319 ± 4 г. Для моделирования тиреотоксикоза ежедневно подкожно вводили L-тироксин в течение 14 дней в суточной дозе 0,04 мг/кг массы тела. Антагонист β -адренорецепторов соталола гидрохлорид вводили в суточной дозе 10 мг/кг массы тела внутривенно в течение 14 дней. Антагонист β -адренорецепторов пролонгированного действия гексопреналина сульфат вводили по 0,001 мг/кг 1 раз в день внутривенно в течение 14 суток. Крысы контрольной группы получали по тем же схемам растворитель препаратов. На 10-е сутки от начала эксперимента всех животных сенсibilizировали эритроцитами барана (10^8 клеток подкожно в подошвенную поверхность правой стопы). На 4-е сутки после

сенсibilизации вводили разрешающую дозу антигена (10^9 эритроцитов подкожно в правую стопу и 0,1 мл изотонического раствора NaCl в левую). Через 24 ч после этого оценивали число ядросодержащих (ЯСК) и анти-телообразующих клеток (АОК) в регионарном лимфатическом узле (ЛУ), степень выраженности реакции гиперчувствительности замедленного типа (ГЗТ), показатели фагоцитарной активности нейтрофилов и моноцитов периферической крови.

Основные результаты. Установлено, что при тиреотоксикозе повышаются степень выраженности реакции ГЗТ, число ЯСК и АОК в регионарном ЛУ. Блокада β -адренорецепторов соталолом гидрохлоридом на фоне тиреотоксикоза выявленные изменения не меняет. При совместном введении тироксина и агониста β -адренорецепторов гексопреналина сульфата по сравнению с крысами, получавшими только тироксин, отмечается снижение числа ЯСК и АОК в регионарном ЛУ и угнетение реакции ГЗТ. При оценке нейтрофильного фагоцитоза у крыс с экспериментальным тиреотоксикозом отмечено повышение относительных и абсолютных показателей, которые увеличиваются в большей степени при совместном введении тироксина и соталола. Введение агониста β -адренорецепторов гексопреналина сульфата на фоне тиреотоксикоза не меняет относительные и повышает абсолютные показатели нейтрофильного фагоцитоза. Тиреотоксикоз не влияет на показатели моноцитарного фагоцитоза. Однако при совместном введении β -адреноблокатора и тироксина относительные и абсолютные показатели моноцитарного фагоцитоза значительно повышаются. При введении агониста β -адренорецепторов на фоне тиреотоксикоза снижаются процент активных фагоцитирующих моноцитов и их фагоцитарный индекс, не изменяются процент фагоцитоза, фагоцитарное число и абсолютные показатели моноцитарного фагоцитоза.

Заключение. Полученные результаты указывают на возможную реализацию влияний при экспериментальном тиреотоксикозе через β -адренорецепторы и зависимость этого действия от перmissивного эффекта тироксина.

Работа поддержана грантами РФФИ 08-04-00424-а и 08-04-00517-а, Программы Президиума РАН «Молекулярная и клеточная биология» и Интеграционного проекта УРО РАН совместно с СО РАН.

ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ГЕТЕРОГЕННОСТЬ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ ЛИМФОЦИТОВ К ДЕЙСТВИЮ АПОПТОТИЧЕСКИХ ФАКТОРОВ СВЯЗАНА С РАЗЛИЧИЯМИ В СИНТЕЗЕ БЕЛКОВ ТЕПЛОВОГО ШОКА

Шмарина Г.В.¹, Пухальский А.Л.¹, Стукалов С.В.¹, Капустин И.В.², Алешкин В.А.²

¹Медико-генетический научный центр РАМН, Москва, Россия

²Московский НИИ эпидемиологии и микробиологии Роспотребнадзора, Москва, Россия

Многие события, играющие ключевую роль в развитии апоптоза, являются объектом регуляции со стороны белков теплового шока (БТШ). Эти филогенетически древние белки-шапероны, синтез которых усиливается в ответ на стресс, минимизируют последствия внешних

повреждающих воздействий на клетку и принимают участие в реализации внутриклеточных восстановительных процессов. Регуляция неспецифических иммунных реакций, а также специфических механизмов иммунной защиты, включая адаптивный иммунитет и поддержание состояния периферической толерантности, тесным образом связаны с индукцией апоптоза в лимфоцитах, принадлежащих к различным субпопуляциям Т-клеток. Вмешательство в этот процесс таких средовых факторов, как клеточные яды или ионизирующее излучение, чревато развитием серьезных заболеваний, в основе которых лежат нарушения иммунорегуляции. Ранее в экспериментах на 4 инбредных линиях мышей нам удалось обнаружить существование двух типов чувствительности Т-клеток к антипролиферативному действию алкилирующих соединений. Так, мыши линий DBA/2 и C57BL/6 были идентифицированы как чувствительные, а мыши линий BALB/c и CC57BR/Mv – как резистентные.

Целью настоящего исследования было изучить роль БТШ70 в определении межлинейных различий чувствительности Т-лимфоцитов к действию различных стрессорных агентов.

Материалы и методы. Опыты проводились на мышах линий BALB/c и C57BL/6. В качестве алкилирующего агента использовали мелфалан в 6 различных концентрациях (0,01-30 мкг/мл). Интенсивность пролиферативного ответа клеток селезенки, стимулированных конканавалином-А, оценивали по включению [³H]-тимидина. Для оценки интенсивности синтеза БТШ70 клетки после инкубации при 42,5 °С обрабатывали гидролизатом белков, меченных C¹⁴. Лизаты меченых клеток исследовали в двумерном электрофорезе. Визуализацию белков проводили методом автордиографии, после чего двумерные автордиограммы подвергали денситометрическому сканированию. Содержание БТШ в клетках оценивали методом Вестерн иммуноблотинга. Уровень мРНК для БТШ70 определяли методом RT-PCR. Для регистрации повреждений ДНК и апоптоза использовали метод диффузии ДНК в агарозном геле (метод комет).

Результаты исследования. Клетки селезенки мышей разных генотипов обнаруживали разную чувствительность к антипролиферативному действию мелфалана. Так, интенсивность супрессии ответа на КонА, представленная в виде ED⁵⁰, для мышей линии C57BL/6 была значимо выше, чем для мышей BALB/c (соответственно 2,01 и 4,47 мкг/мл; $p < 0,5$). Было также показано, что клетки мышей обеих линий, подвергшиеся тепловому шоку, становились более резистентным к действию алкилирующих агентов. Повреждения ДНК и признаки апоптоза были более выраженными у мышей линии C57BL/6, чем у мышей BALB/c (соответственно, величина «хвостовых моментов» составила 3,2 и 2,0 Ед; $p < 0,5$). Методом двумерного электрофореза было также показано, что содержание и синтез *de novo* БТШ-70 в клетках мышей линии BALB/c было существенно выше, чем у мышей C57BL/6.

Заключение. Полученные результаты подтверждают данные относительно адаптивной роли БТШ у пойкилотермных животных, принадлежащих к популяциям, обитающим в зонах с контрастными температурными условиями. В наших предыдущих исследованиях было показано, что механизмы действия нецитотоксических концентраций алкилирующих соединений на клетку связано с нарушением сигнальных каскадов, запускаемых в результате взаимодействия мембраноассоциированных рецепторов с соответствующим лигандом (например,

IL-2R – IL-2, TNFR – TNF α , FAS – FASL). Можно предполагать, что БТШ, будучи белками-шаперонами, способны предохранять участок возможного алкилирования и/или восстанавливать третичную структуру белка, нарушенную алкилирующим агентом. В этом случае высокие продуценты БТШ должны иметь преимущества при воздействии неблагоприятных факторов внешней среды.

УЧАСТИЕ КАТИОНОВ МЕДИ И ЦИНКА В РЕГУЛЯЦИИ ВЫРАБОТКИ ИНТЕРФЕРОНА (IFN) ЛЕЙКОЦИТАМИ ЧЕЛОВЕКА

Юшкова Е.Н., Ефремова И.Е., Бабаянц А.А., Чекнёв С.Б.

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

Участие катионов металлов в регуляции функций клеток иммунной системы хорошо известно. В то же время накапливаются данные о способности указанных катионов регулировать иммуногенез не только прямым воздействием, но и опосредованно – за счет изменения конформации хелатирующих их иммуноактивных соединений. В последние годы установлено, что катионы меди и цинка, а также связавшие их и модифицированные ими белки γ -глобулиновой фракции индуцируют выработку лейкоцитами периферической крови человека пула IFN с преимущественным содержанием IFN γ .

Целью работы явилась оценка динамики выработки IFN γ в присутствии свободных катионов меди и цинка, а также конформационно измененных ими белков γ -глобулиновой фракции плазмы крови.

Материалы и методы. Индукцию IFN в суспензиях лейкоцитов, полученных от здоровых доноров, проводили в полной питательной среде, приготовленной на основе среды двойной Игла, в течение 24 и 48 ч. Образцы модифицированного связыванием меди и цинка человеческого сывороточного γ -глобулина (ICN) применяли 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, связавшегося с белком. Контрольным индуктором выработки IFN служил фитогемагглютинин Р (ФГА, Difco, 1,0 мкг/мл). Титрование IFN проводили на монослойной культуре диплоидных фибробластов эмбриона человека против 1 ЦПД₅₀ вируса энцефаломиокардита мышей. Содержание IFN γ в культуральной жидкости лейкоцитов определяли методом иммуоферментного анализа, применяя соответствующие наборы (протеиновый контур).

Результаты. На ранние сроки (24 ч) инкубации катионы меди и цинка индуцируют выработку IFN γ на том же уровне, что и контрольный γ -глобулин (110-175 пг/мл). Модификация цинком ослабляет, а медью – усиливает реализацию IFN-индуцирующих свойств γ -глобулина. В течение последующих 24 ч наблюдения выработка IFN γ нарастает до 460 пг/мл в условиях индукции цинком и до 340 пг/мл в условиях индукции медью. Выработка IFN, индуцированного контрольным γ -глобулином, определяется на уровне 300-320 пг/мл. Связывание цинка γ -глобулином переводит белок в такое конформационное состояние, что выработка в его присутствии IFN γ не нарастает в динамике наблюдения и сохраняется в пределах

125 пг/мл. Поэтому на поздних сроках (48 ч) инкубации индукция IFN связавшим цинк γ -глобулином оказывается в 3-4 раза меньшей по сравнению с контрольным белком и катионами цинка, примененными изолированно. Образцы белка, трансформированного медью, сопоставимы в этих условиях со своими контролями. Следовательно, они индуцируют выработку IFN γ на уровне, в 2,5 раза превышающем эффекты γ -глобулина, трансформированного цинком.

Заключение. Использованная экспериментальная система обнаруживает не известные ранее свойства катионов меди и цинка. В условиях связывания белками γ -глобулиновой фракции плазмы крови, первичной трансформации Fc фрагментов молекул антител и последующего запуска каскада сигнальных путей с активированных Fc рецепторов они способны поляризовать иммунный ответ, оппозиционно изменяя индукцию IFN γ связавшим их γ -глобулином. При этом цинк, ослабляя индукцию IFN γ , может смещать иммуногенез в направлении Th-2, тогда как медь, усиливая индукцию IFN γ , должна способствовать активации Th-1.

IN THE LOCAL IMMUNE RESPONSE IN HUMAN TUBERCULOUS LUNG LESIONS B CELLS CO-FUNCTION WITH MACROPHAGES AS ANTIGEN-PRESENTING CELLS AND PRODUCE SPECIFIC ANTIBODIES

Kosmiadi G.A.¹, Trusov V.N.², Yevgushenko G.V.¹, Smirnova T.G.¹, Avdienko V.D.¹, Didenko G.V.², Ulrichs T.³

¹ Central Tuberculosis Research Institute of RAMS, Moscow, Russia

² Moscow City Research and Practical Center for Tuberculosis, Moscow, Russia

³ Koch-Metchnikov-Forum, Berlin, Germany

The mechanisms of effector immunity and immunologic correlates in tuberculosis are largely unknown while studies of local immune responses to *Mycobacterium tuberculosis* infection in human lung tissue could cast some light onto these mechanisms. We aimed at studying morphology and functions of immune cells infiltrating TB-infected lung in humans. We studied phenotypes, cytokine production, antigen presentation and antibody production in vivo in response to *M. tuberculosis* antigens.

Cells of the infiltrates in the infected lung were identified in sections using monoclonal antibodies. Mycobacterial load and infiltrating inflammatory cell load to the lung were studied. We show that in patients with tuberculoma, cultivable *M. tuberculosis* could hardly be detected, while RT-PCR results always showed DNA-presence in the tissue. Macrophage numbers correlated directly, while their phagocytic capacity correlated inversely with *M. tuberculosis* load to the lung. We show that infiltrating lymphocytes of different phenotypes as well as macrophages and antigen presenting cells place themselves not in a chaotic, but rather organized manner within the granulomatous tissue. They bear markers of activation and differentiation and are capable of proliferation, cytokine production and synthesis of specific IgG, IgA and IgM antibodies. Patients with high mycobacterial load produce IgG1 instead of IgG2 in their local immune response. Lymphoid follicle-like structures in the lung tissue were associated with the diagnosis of tuberculoma, but not active cavitary tuberculosis, which indicates their active roles. At the

same time, the results suggest that mycobacterial infection induces organization of immune cells in morphologically discernable follicle-like structures bearing features of a tertiary lymphoid organ analogous to that found in autoimmunity-affected tissue. We propose that these tertiary lymphoid organs orchestrate the local immune response to mycobacteria in humans and that B cells play an important role in regulating the local containment of mycobacteria.

INCOMPLETE MASTECTOMY AND INTERLEUKIN-2 ADJUVANT IMMUNOTHERAPY: FLOW CYTOMETRY AND HISTOPATHOLOGY ANALYSES

Tan J.F.V.¹, Semushina S.G., Moiseeva E.V.

*Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia,
¹ Free University, Medical Center, Amsterdam, The Netherlands*

Introduction. Surgical extirpation is a standard method of mammary cancer (MC) treatment; however, both in human and veterinary patients some tumors can not be fully removed. Single peritumoral interleukin-2 (IL-2) treatment is known to retard slowly growing spontaneous mouse mammary carcinomas with short latent period (lag^{short}). Intratumoral IL-2 was shown to result in systemic immunity in SL-2 mouse lymphoma model. Therefore, we developed new spontaneous mouse model with partial tumor excision to reproduce clinical cases of incomplete mastectomy with a single IL-2 treatment in tumor residue.

Objectives. Our objective was to test IL-2 efficacy in this model, to find out prognostic value if any of tumor infiltrating leukocytes (TIL) distribution in extirpated tumor on survival after surgery, and reveal IL-2 influence upon histopathology and TIL distribution in residue tumor. In addition, we wanted to know whether tumor growth peculiarities before surgery were of prognostic value for recipient survival.

Materials and methods. In 19 female mice the spontaneous MCs were partly excised, e.g. ~ 30% of the tumor was left. Eight of these mice received in the remaining tumor 1×10^6 IU of IL-2 with charcoal that was used to localize histologically the site of IL-2 application. 11 control mice were treated during partial surgery with PBS plus charcoal (n = 6) or PBS alone (n = 5). Extirpated tumors were analyzed by histopathology (periodic

acid staining) and flow cytometry. Among TIL populations we have tested the proportion of $CD45^+$, $CD44^+$, $CD3^+$, $CD4^+$, $CD8^+$, $NK1.1^+$, $CD3^+/NK1.1^+$, $CD19^+$, $CD11b^+$, $F4/80^+$, and $CD11b^+/F4/80^+$ cells.

Results. No differences in average life span post-surgery were found related to IL-2 treatment during incomplete mastectomy. We did, however, find a tendency to an inverse correlation between the B-lymphocyte proportion among TIL population in extirpated tumor samples and recipient survival. Short and long survivors were observed in both treated and control groups; IL-2 prolonged survival of long survivors. Our common approach to analyze lag^{short} and lag^{long} tumor sets separately (short and long latent periods, respectively) failed to reveal IL-2 treatment benefit as short and long survivors were found both in lag^{short} and lag^{long} subgroups. Therefore, tumor-bearing females were divided in two subsets due to the presence or absence of sudden hop in tumor size at the moment of partial surgery (hop^+ and hop^- , respectively). We believe that hop is mounting size of the tumor nodule, rather in connection with emerging of cystic structure than in connection with faster tumor growth.

Control females with hop^- tumors survived longer than ones with hop^+ tumors. Both control and treated hop^+ tumors dropped to short survival and only females with hop^- tumors got benefit of IL-2 treatment. Furthermore, females with $lag^{long}hop^-$ tumors survived longer than bearing $lag^{short}hop^-$ ones. Flow cytometry analysis showed that in TIL of hop^- tumor samples activated leucocytes prevailed, Bcell proportion was reduced, macrophages, proportions of T and NK cells were elevated comparing with hop^+ TIL.

Histopathology analysis showed more necrotic areas around charcoal in IL-2 treated tumor residues than around charcoal in PBS treated ones. Intriguingly, extremely activated macrophages containing multiple PAS-positive purple granules were found only in the IL-2 treated samples of tumor residues.

Conclusions. IL-2 treatment during incomplete mastectomy was not clearly effective for the whole treated group. However, absence of hop in tumor growth determined IL-2 treatment benefit. Both control and IL-2 treated the longest survivors got $lag^{long}hop^-$ tumors with spontaneous signs of tumor rejection in extirpated tumor samples. Immunophenotyping showed elevated T and NK cell proportions within TIL of hop^- tumors.