Медицинская Иммунология
2006, Т.8, № 2-3
© 2006, СПб РО РААКИ

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

МОРФОЛОГИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ХРОНИЧЕСКОГО ГРАНУЛЕМАТОЗНОГО ВОСПАЛЕНИЯ В ТКАНИ ЛЕГКИХ ИНБРЕДНЫХ МЫШЕЙ, ВЫЗВАННОГО *M.AVIUM*

Авербах М.М., Кондратьева Е.В., Мищенко В.В.

ГУ Центральный НИИ туберкулеза РАМН, Москва, Россия

Введение. Зависимость характера течения инфекционного процесса от фенотипа макроорганизма - широко известный научный факт, он описан для инфекционных заболеваний, вызываемых самыми различными микроорганизмами. Ранее были выявлены линии инбредных мышей C57BL/6 и BALB/C, чувствительные и линии A/Sn и DBA/2 резистентные к внутривенному заражению *M. Avium.*

Целью настоящего исследования явилось воспроизведение и морфологическая характеристика инфекционного процесса, вызванного аэрогенным введением штамма *M. avium* 724 R на инбредных мышах линий C57BL/6 (чувствительных к *M. avium*) и I/St (чувствительных к *M. tuberculosis*).

Материал и методы. Мышей заражали аэрогенно в камере культурой *M. avium*, выращенной на полной жидкой среде Дюбо в стандартных условиях. В камеру помещалось 10мл суспензии *M.avium,* содержащей 8 x10^6 КОЕ /10 мл. Для контроля за попаданием микобактерий в легкие гомогенаты легких мышей каждой линии высевали через 24 ч после инфицирования. Было показано, что доза заражения составляет в среднем 2,4x10^3 КОЕ/мышь. Высеваемость *M. avium* из ткани легких оценивали методом посева гомогенатов на твердую питательную среду и подсчетом микроколоний на 21 день культивирования, морфологические изменения легочной ткани изучали на криостатных срезах , окрашенных гематоксилином и эозином на 3,8 и 16 неделях после заражения.

Результаты. Результаты высеваемости *M. avium* из ткани легких представлены в таблице.

КОЛИЧЕСТВО КОЕ В ЛЕГКИХ МЫШЕЙ ИНБРЕДНЫХ ЛИНИЙ I/ST И B6 ПОСЛЕ АЭРОГЕННОГО ЗАРАЖЕНИЯ 2,4X10^3 МИКРОБНЫХ ТЕЛ

Линии мышей	3 недели	8 недель	16 недель
C57BL/6	(2,2 ± 0,77) x 10^7	(3,5± 0,9) x 10^9	(2,9± 1,7) x 10^{10}
I/St	(1,44 ± ,41) x 10^6	(3,1 ± 1,8) x 10^{6*}	(3,07 ± 0,8) x 10^{8*}

* p<0,05

Показано, что статистически значимые различия в содержании *M. avium* в ткани легких наблюдались на 8 и 16 неделях после заражения и составляли для линии C57BL/6 (3,5± 0,9) x 10^9 (2,9± 1,7) x 10^{10} и для линии I/St (3,1 ± 1,8) x 10^6 (3,0 ± 2,8) x 10^8 соответственно. Морфологически через 3 недели после заражения в легких мышей исследуемых линий отмечены начальные признаки развития гранулематозного воспаления в виде диффузной мононуклеарной инфильтрации. В последующие сроки исследования межлинейные различия в характере течения гранулематозного воспаления становились более значительными. Так, через 8 недель в легких мышей C57BL/6 отмечено образование многочисленных, различных по размеру гранулем, которые характеризовались наличием крупных макрофагальных и эпителиоидных клеток в центральной части, окруженных лимфоцитарным валом. В легких мышей линии I/St при схожести в целом морфологических изменений имелись некоторые отличия в характере гранулематозного процесса. Так, субплеврально гранулемы чаще состояли из крупных макрофагальных клеток, а вблизи сосудов и бронхов макрофагальная центральная часть гранулемы была окружена небольшим лимфоцитарным валом. Через 16 недель после заражения различия в морфологической картине специфического воспаления носили выраженный характер. У мышей линии C57BL/6 отмечены обширные участки ателектаза легочной ткани с уплотнением, отеком и полнокровием ткани и диффузной воспалительной преимущественно мононуклеарной инфильтрацией. В этих участках и в других отделах легких имелись различные по размеру гранулемы, имеющие центральную макрофагальную часть с явлениями распада ткани, и широкий лимфоцитарный вал. В ряде участков лимфоциты формировали образования на подобие фолликулов. В участках ателектаза ткани легких выявлялись множественные мелкие и крупные некротические очаги. У мышей I/St также имелись небольшие участки воспаления по типу пневмонии. В этих и других участках располагались многочисленные гранулемы. Более крупные характеризовались наличием макрофагального центра, в котором располагались крупные макрофаги и эпителиоидные клетки, встречались двуядерные макрофаги. Центральные макрофагальные участки были окружены валом из лимфоцитов. В целом площадь поражения легочной ткани у мышей I/St была значительно меньшей.

Таким образом, нами получены выраженные различия высеваемости микобактерий в морфологической картине течения инфекционного процесса, вызванного *M. avium* штамма 724 R. Поскольку при заражении

мышей этих линий *M. tuberculosis* наблюдается обратная ситуация и мыши I/St являются чувствительными, а C57BL/6 резистентными, то вероятно, что различия в течении инфекционного процесса связаны с обусловленными фенотипически разными уровнями реакций врожденного и приобретенного иммунитета макроорганизма на антигенные субстанции этих видов микобактерий.

Результаты собственных исследований получены при поддержке гранта РФФИ (05-04-48787).

ЛПС- И ФМА-ИНДУЦИРОВАННОЕ ИЗМЕНЕНИЕ СОДЕРЖАНИЯ БТШ70 В ЛИМФОИДНЫХ КЛЕТКАХ

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

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

Уровень экспрессии белков теплового шока (БТШ) клетками всех типов увеличивается в условиях стресса. Это позволяет рассматривать внутриклеточное содержание БТШ как признак, позволяющий отличать нормальное и стрессированное состояние клеток. Очевидно, что указанный подход к оценке клеточного статуса весьма актуален для лимфоидных тканей, состояние которых отражает статус иммунной системы всего организма.

В наших предыдущих исследованиях анализ внутриклеточного содержания БТШ70 у лимфоидных клеток, погибающих по программе стресс-индуцированного апоптоза, свидетельствовал о продукции данных протеинов популяциями активированных лимфоцитов в межклеточное пространство. Целью настоящей работы явилось исследование кинетики внутриклеточного содержания БТШ70 у клеток костного мозга мыши в моделях их активации стандартными активирующими агентами – бактериальным липополисахаридом (ЛПС) и синтетическим ФМА (форбол-12-миристат-13-ацетат).

Полученные данные выявили парадоксальное снижение внутриклеточного содержания БТШ70 в клетках костного мозга в первые часы их реакции на ЛПС и ФМА. Действительно, хорошо известно, что указанные активирующие факторы являются индукторами клеточного стресса. Однако вместо ожидаемого увеличения уровня экспрессии БТШ70 сразу после предъявления этих стимулов в нашей модели, мы зарегистрировали достоверное уменьшение количества БТШ70 в клетках костного мозга, проинкубированных в течение 1 часа с ЛПС или ФМА. Вместе с тем, более длительное время инкубации клеток с данными реагентами (16-21 ч) сопровождалось адекватным ростом уровня экспрессии внутриклеточных БТШ70. Мы предполагаем, что зарегистрированное снижение содержания БТШ70 в клетках костного мозга на начальном этапе их реакции на ЛПС и ФМА связано с выбросом этих протеинов в межклеточное пространство. Протективный эффект экзогенных БТШ70 в популяциях лимфоцитов был продемонстрирован нами ранее, поэтому продукция БТШ70 в межклеточное пространство под действием стрессирующих агентов может рассматриваться как один из способов защиты всего клеточного сообщества от повреждающего действия стресса.

ПРИМЕНЕНИЕ АНАЛИЗА ИНФОРМАЦИОННОЙ СТРУКТУРЫ БЕЛКОВ ДЛЯ ПОИСКА В-КЛЕТОЧНЫХ ЭПИТОПОВ

Алексеева Л.Г., Некрасов А.Н., Марченко А.Н., Шевченко М.А., Беневоленский С.В., Свирщевская Е.В.

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

Введение. Для получения вакцин в последнее время всё чаще стали использовать не полноразмерные белки, а их фрагменты, соответствующие доминантным Т- и/или В-клеточным эпитопам, которые способны индуцировать протективный иммунный ответ. В этой связи представляется весьма привлекательной возможность отбора иммунологически активных участков белков на основе только теоретического анализа их первичных аминокислотных последовательностей. Однако эффективность всех предложенных до настоящего момента методов предсказания антигенных детерминант составляет от 15 до 75% в зависимости от используемого метода и структуры белка.

Цель и задачи. В данной работе проведен анализ взаимосвязи известных В-клеточных эпитопов с информационной структурой белков-аллергенов из грибов *A.fumigatus* Asp f 2 и Asp f 3, аллергена домашней кошки Fel d 1, лизоцима белка куриного яйца, миоглобина кашалота и белка вируса табачной мозаики (ВТМ).

Материалы и методы. Расчет информационной структуры белков проводился по методике и с параметрами, представленными в работе [Nekrasov, A. *J. Biomol. Struct. Dyn*., 21, 615 (2004)]. Ранее при анализе наборов негомологичных белков было показано, что зависимость позиционной информационной энтропии как функции расстояния между аминокислотными остатками (ао) имеет S–образную форму. Во-первых, это указывает на то, что в белковых последовательностях существуют участки с повышенной степенью координации между ао, названные нами IDIC-сайтами. Во-вторых, было обнаружено, что в пределах 6 позиций наблюдается высокий уровень координации между ао. Основываясь на этих данных, был разработан метод, позволяющий находить в белковых последовательностях IDIC-сайты различной длины, формирующих его информационную структуру (ИС). ИС имеет иерархическую организацию, в которой наблюдаются участки с аномально плотно расположенными элементами нижнего уровня иерархии (ADD^+-сайты).

В-клеточные IgG связывающие эпитопы Asp f 2 и Asp f 3 были определены с использованием сывороток мышей линий BALB/c, CBA и C57BL6, иммунизированных полноразмерными белками, и панели синтетических пептидов, перекрывающих аминокислотную последовательность белков Asp f 2 и Asp f 3 на 67 и 91% соответственно. В-клеточные IgE, связывающие эпитопы этих белков, были определены с использованием сывороток крови больных аллергическим аспергиллезом.

Информация о локализации В-клеточных эпитопов в остальных белках была получена из литературных данных.

Результаты. IDIC-диаграммы для белков Asp f 2 и Asp f 3, лизоцима, миоглобина и белка ВТМ были сопоставлены с положением выявленных ранее В-клеточных эпитопов. 67,6% В-клеточных эпитопов данных белков были расположены вне ADD^+-участков, 29,7% - в ADD^+-сайтах, содержащих положительно заряженные аминокислотные остат-

ки Lys и/или Arg, и только один эпитоп (2,7%) был локализован на ADD$^+$-участке, не содержащем Lys и/или Arg. При этом протяжённость ADD$^+$-участков с положительно заряженными аминокислотами составляла для всех проанализированных белков всего лишь 11-12% от общей последовательности белка. Таким образом, частота встречаемости В-клеточных эпитопов в этих областях была в 10 раз выше, чем в ADD$^+$-сайтах, не содержащих Lys и/или Arg, и в 3 раза выше, чем для участков белков вне ADD$^+$-сайтов. Для проверки полученной информации были отобраны два пептида из ADD$^+$-участков, имеющих в своём составе Lys/Arg, аллергена Fel d 1. Выбранные пептиды были экспрессированы в составе дрожжевых вирусоподобных частиц (ВПЧ), которые использовали для иммунизации мышей, что приводило к продукции IgG-антител на пептиды, распознающих также нативный антиген.

Выводы. Показано, что анализ информационной структуры белков позволяет проводить отбор пептидов, являющихся В-клеточными эпитопами.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ МОЛЯРНОГО СООТНОШЕНИЯ ПЕПТИД-БЕЛОК В БЕЛКОВЫХ КОНЪЮГАТАХ МЕТОДОМ SELDI-MS

Алешина Е.Ю., Мошковский С.А., Кураева Т.Е., Кузьмина Т.И., Колесанова Е.Ф.

ГУ НИИ Биомедицинской химии им. В.Н. Ореховича РАМН, Москва, Россия

Синтетические пептиды широко применяются в качестве антигенов для получения антипептидных антител, которые нашли широкое применение в самых различных областях биохимии, медицины и генной инженерии, в том числе в разработке искусственных вакцин и диагностикумов.

В большинстве случаев пептиды молекулярной массы меньше, чем 2-5 кДа, неиммуногенны, поэтому, чтобы получить антитела к коротким пептидам, необходимо связать их с белками. При сравнении иммуногенности пептидов и разработке молекулярных методов диагностики на их основе решающее значение имеет количество молекул пептида на поверхности молекулы белка.

Цель работы – установить точное количество молекул пептида в белковых конъюгатах, полученных для изучения антигенности пептидов – фрагментов оболочечного белка вируса гепатита С.

Материалы и методы. Для исследования было получено 23 конъюгата. Пептиды, входящие в состав конъюгатов, соответствуют аминокислотным последовательностям высококонсервативных фрагментов оболочечного белка Е2 вируса гепатита С. Пептиды конъюгировали с белками-носителями овальбумином (ОВА), миоглобином лошади (МГ) и бычьим сывороточным альбумином (БСА) с помощью глутарового альдегида, N-гидроксисукцинимидного эфира 3-малеимидобензойной кислоты (МБС), диметилсуберимидат (ДМС), 1-(3-диметиламинопропил)-3-этилкарбодиимида (КД). Качественное определение реакции конъюгации проводили с помощью электрофореза в полиакриламидном геле. Для определения молярного соотношения пептид:белок конъюгаты подвергали SELDI-масс-спектрометрическому анализу (“Ciphergen”, США), используя декстраноподобную подложку для сорбции конъюгатов.

Основные результаты. Методом SELDI-масс-спектрометрического анализа было установлено, что все полученные конъюгаты имеют полимерную структуру за счет образования связей между белками-носителями (до 4 молекул), где количество молекул конъюгированного пептида пропорционально количеству молекул пептида в одномолекулярном конъюгате. В целом, молярное соотношение пептид:белок в конъюгатах варьировалось от 1:1 до 13,6:1.Также установлено, что конъюгаты, полученные с использованием глутарового альдегида, более разнообразны по числу молекул пептида, присоединенных к белку-носителю, что увеличивает вероятность получения антипептидных антител. Так, например, не удалось получить антитела к пептиду, конъюгированному с использованием ДМС, тогда как при использовании глутарового альдегида для конъюгации того же пептида удалось получить антипептидные антитела.

Заключение. Исследование показало, что SELDI-масс-спектрометрический анализ является эффективным методом для определения молярного соотношения пептид:белок в конъюгатах и позволяет проводить сравнительный анализ антигенности пептидов при конструировании синтетических пептидных вакцин.

Работа поддержана Федеральной программой РАМН “Живые системы. Лот 1 ЖС-КП 6/003”.

ВЛИЯНИЕ α-ДЕФЕНСИНОВ ЧЕЛОВЕКА НА ЭКСПРЕССИЮ ГЕНОВ ЦИТОКИНОВ МОНОНУКЛЕАРАМИ КРОВИ КРЫС В УСЛОВИЯХ СТРЕССОРНОГО ВОЗДЕЙСТВИЯ

Алешина Г.М.[1], Рогачева О.Н.[2]

[1] ГУ НИИ экспериментальной медицины РАМН, Санкт-Петербург, Россия;

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

Для формирования адекватного иммунного ответа, определяющего успех в борьбе с патогенами, необходимо взаимодействие факторов врожденного и приобретенного иммунитета. Стрессорные воздействия могут оказывать существенное влияние на эффективность этого взаимодействия. В состоянии стресса меняется соотношение провоспалительных и противовоспалительных цитокинов в тканях, что приводит к стимуляции или угнетению иммунной системы. Для коррекции таких изменений в настоящее время интенсивно исследуются перспективы применения иммуномодуляторов, в частности эндогенных антимикробных пептидов α-дефенсинов. Источником α-дефенсинов являются в основном нейтрофильные гранулоциты. Пептиды высвобождаются из клеток в зоне воспаления, где, помимо прямого антибиотического действия, выполняют роль связующего звена между врожденным и приобретенным иммунитетом, стимулируя хемотаксис и пролиферацию иммунных клеток, а также продукцию антител. Увеличение количества нейтрофилов в крови во время стрессорного воздействия позволяет говорить об участии α-дефенсинов в регуляции иммунного ответа в состоянии стресса. Об этом же свидетельствует кортикостатическая активность α-дефенсинов, а также их способность увеличивать количество антителообразующих клеток в селезенке при непосредственном стрессорном воздействии. Однако влияние на экспрессию цитокинов было показано для α-дефенсинов только в условиях *in vitro*, хотя именно цитокиновой сети отводится ведущая роль в формировании иммунного ответа, в том числе и в состоянии стресса.

Целью настоящей работы является изучение возможного модулирующего действия α-дефенсинов на функционирование цитокиновой сети у крыс в условиях стрессорного воздействия. Были поставлены следующие задачи: 1) исследовать экспрессию генов про- (IL-1β, IL-12) и противовоспалительных (IL-4, IL-10) цитокинов мононуклеарной фракцией крови крыс в условиях электроболевого стрессорного воздействия и введения липополисахарида (ЛПС); 2) исследовать влияние α-дефенсинов человека на экспрессию генов про- и противовоспалительных цитокинов в мононуклеарной фракции крови крыс в условиях стрессорного воздействия.

В качестве модели экспериментального стресса использовался электроболевой шок и введение ЛПС. Крыс иммобилизовали в пластмассовых цилиндрических контейнерах, соответствующих размерам крысы, и к электродам, подсоединенным к обоим голеностопным суставам, в течение часа каждые 8-10 секунд подавали импульсы тока (10мкА). Через час крысам вводили ЛПС и/или дефенсины и еще через 2 часа производили забор крови и выделяли фракцию мононуклеарных лейкоцитов. Из полученных клеток выделяли тотальную РНК и с помощью методов обратной транскрипции и полимеразной цепной реакции оценивали экспрессию генов исследуемых цитокинов. В качестве гена сравнения использовали ген глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы. Так как иммобилизация представляет собой самостоятельное сильное стрессорное воздействие, крысы проходили адаптацию к условиям эксперимента – в течение 6 дней на 1 час их сажали в контейнеры, лишающие возможности двигаться, но электроболевому воздействию не подвергали.

В ходе работы получены следующие результаты: 1) в условиях используемой модели стресса электроболевой шок, введение α-дефенсинов человека или ЛПС стимулируют экспрессию гена IL-12 мононуклеарами крови крыс; 2) стимуляция экспрессии гена IL-1β происходит только при введении ЛПС; 3) введение α-дефенсинов человека снижает уровень экспрессии генов IL-12 и IL-1β, вызванной электроболевым воздействием или введением ЛПС; 4) в условиях используемой модели стресса не выявлено экспрессии генов IL-4 и IL-10 в мононуклеарах.

Таким образом, совокупность полученных результатов свидетельствует о способности α-дефенсинов модулировать уровень экспрессии генов цитокинов в условиях стрессорного воздействия.

Работа поддержана грантом РФФИ № 06-049416.

ОЦЕНКА СТИМУЛИРУЮЩЕГО ВЛИЯНИЯ ПРЕПАРАТА ИММУНОВЕНИН НА ФУНКЦИОНАЛЬНО-МЕТАБОЛИЧЕСКУЮ АКТИВНОСТЬ ФАГОЦИТОВ МЕТОДОМ РЕГИСТРАЦИИ ХЕМИЛЮМИНЕСЦЕНЦИИ

Алсынбаев М.М., Туйгунов М.М., Исрафилов А.Г., Фархутдинов Р.Р., Медведев Ю.А., Мочалов К.С., Маннанова И.В.

Филиал ФГУП «НПО «Микроген» МЗ и СР РФ «Иммунопрепарат», ГОУ ВПО Башкирский государственный медицинский университет МЗ и СР РФ, г.Уфа, Россия.

Исследовано влияние коммерческого препарата иммуноглобулинов для внутривенного введения Иммуновенина (ИВ) производства ФГУП «НПО «Микроген» МЗ и СР РФ «Иммунопрепарат» в г. Уфе на способность интактных (из крови) и активированных (из перитонеального экссудата суточного асептического воспаления) полиморфноядерных фагоцитов крыс продуцировать биоцидные окислители, выявляемые регистрацией хемилюминесценции, индуцируемой люминолом (ХЛ) на приборе ХЛ-003 (производства Межвузовской лаборатории технических систем медико-биологических исследований Уфимского государственного авиационного технического университета, г.Уфа). После 30-минутной инкубации с ИВ у полиморфно-ядерных лейкоцитов крови и перитонеального экссудата фагоцитоз частиц латекса сопровождался достоверным увеличением уровня ХЛ в сравнении с контролем (инкубация в отсутствии ИВ) на 40-50% светосуммы реакции. Этому сопутствовали адекватно выраженные увеличение поглотительной способности фагоцитов в отношении названных частиц (возрастание фагоцитарного индекса и показателя интенсивности фагоцитоза) и усиление вызываемой латексом активации кислородзависимого метаболизма (увеличение показателей индуцированного НСТ-теста). При индукции полиморфно-ядерных лейкоцитов воспалительного перитонеального экссудата объектами, взамодействующими с фагоцитами через разные рецепторы (частицы зимозана и латекса, клетки стафилококка) интенсивность ХЛ под влиянием ИВ возрастала в 3,8 раза – при использовании в качестве объекта фагоцитоза частиц зимозана, в 1,4 – микросфер латекса и 1,9 – живых клеток стафилококка. Различия в активности воздействия на интенсивность ХЛ - ответа тех или иных видов фагоцитов (полиморфно-ядерные лейкоциты, резидентные и активированные макрофаги) при стимуляции микробными и другими стимуляторами продемонстрированы у препаратов иммуноглобулинов для внутривенного введения разных производителей, а также у отдельных серий ИВ. Таким образом, коммерческий препарат иммуноглобулинов для внутривенного введения ИВ оказывает стимулирующее влияние на процессы взаимодействия фагоцитирующих клеток с разными объектами, включая потенциальные патогены, степень которого может быть сравнительно оценена с помощью ХЛ.

ВЛИЯНИЕ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО ЛАКТАТ-АЦИДОЗА НА ГЕМОСТАЗ И МОРФОЛОГИЮ ЛИМФАТИЧЕСКИХ УЗЛОВ

Альфонсов В.В., Альфонсова Е.В., Бочкарникова Н.В.

Забайкальский государственный педагогический университет, Чита, Россия

Метаболический ацидоз представляет реальную опасность для организма, так как способен нарушать функции и приводить к морфологическим изменениям в различных органах. В то же время патогистологические изменения в органах и тканях при ацидозе остаются во многом невыясненными, особенно это касается иммунной системы.

Целью нашего исследования явилось изучение закономерностей развития ДВС-синдрома и морфологии лимфатических узлов при остром лактат-ацидозе.

В наших исследованиях на животных (42 кошки) моделировался лактат-ацидоз в/в капельным введением молочной кислоты (3% раствор лактата на физрастворе) до достижения сдвига pH крови в различных сериях опытов: 7,2; 7,0; 6,8; 6,5. По мере развития некомпенсированного ацидоза из различных регионов сердечно-сосудистой системы забирались образцы крови на 15, 30, 60 и 120 минуте для определения показателей системы гемостаза, кусочки органов подвергались гистологическим и

МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ ПАРАМЕТРЫ ПОДЧЕЛЮСТНЫХ ЛИМФОУЗЛОВ ПРИ ЛАКТАТ-АЦИДОЗЕ У КОШЕК (M±m)

Исследуемые параметры	Контрольные животные n = 13	Опытные животные n = 13	
	pH 7,4 -7,36	pH 7,2 - 7,0	pH 6,8 - 6,5
Капсула (мкм)	38,8 ± 3,8	102,0 ± 6,3 p < 0,001	113,0 ± 5,4 p < 0,001
Подкапсулярная трабекула (мкм)	32,0 ± 2,7	39,4 ± 2,6 p < 0,001	45,0 ± 2,5 p < 0,02
Корковый синус (мкм)	58,2 ± 4,2	79,8 ± 5,6 p < 0,01	97,8 ± 7,3 p < 0,01
Промежуточный синус коркового вещества (мкм)	34,8 ± 3,8	58,4 ± 4,8 p < 0,001	64,2 ± 4,6 p < 0,001
Промежуточный синус мозгового вещества (мкм)	58,3 ± 4,3	48,7 ± 3,3 p < 0,01	83,6 ± 8,4 p < 0,01
Количество клеток в герминативном центре лимф. фолликулов на ед. пл.	190,7 ± 10	160,6 ± 7,2 p < 0,01	130,3 ± 4,6 p < 0,001

Примечание: p - достоверность различий в опыте по сравнению с контролем, n – число лимфоузлов.

электронно-микроскопическим исследованиям по общепринятым методикам.

Экспериментальный ацидоз различной глубины (pH 7,2-6,5) и продолжительности (от 15 мин до 2 ч) в лимфатических узлах различных регионов приводит к достоверным изменениям в паренхиме, сосудистом русле и соединительнотканной строме. В микроциркуляторном русле при ацидозе развивается ДВС-синдром, обнаруживаются сладжи эритроцитов, тромбы фиксированные к стенке артерий и вен, десквамация эндотелиоцитов. По данным электронной микроскопии, при pH крови 7,2 (15 мин) нарушается структура цитоплазматической мембраны эндотелиоцитов, появляются везикулы, которые отрываются и попадают в кровоток, при pH 7,0 эндотелиоциты разрушаются, их органоиды поступают в капиллярное русло.

В лимфоузлах прослеживается утолщение капсулы, подкапсулярных трабекул, достоверные изменения размеров синусов, наблюдается делимфатизация герминативных центров лимфоидных фолликулов, постепенно разрушается аргирофильный каркас (таблица).

В отдаленные сроки после перенесенного ацидоза (7-14 сутки) отмечается разрастание коллагеновых волокон при уменьшении содержания эластического и аргирофильного компонента. В лимфоидных фолликулах отсутствует Т-зона, сглаживаются границы между корковым и мозговым веществом, нарастают деструктивно-дегенеративные изменения в соединительнотканной строме и паренхиме органов.

Заключение. Результаты нашего исследования выявили неспецифические деструктивные изменения в лимфоузлах.

ОДНА ИЗ ВОЗМОЖНЫХ ФУНКЦИЙ ЦИРКУЛИРУЮЩИХ ВНЕКЛЕТОЧНЫХ БТШ70 В СИСТЕМЕ ИММУНОЛОГИЧЕСКОГО НАДЗОРА

Апполонова М.В., Мурашко Д.А., Шустова О.А., Сапожников А.М.

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

В последние годы в целом ряде работ было продемонстрировано присутствие циркулирующего внеклеточного пула БТШ70 в организме человека и лабораторных животных. Источник внеклеточных БТШ70 пока неизвестен, однако наши результаты и данные других авторов свидетельствуют о том, что одним из продуцентов этих протеинов может быть лимфоидная ткань. Функции циркулирующих сывороточных БТШ70 практически не изучены, хотя показано, что экзогенные БТШ70 адсорбируются на клеточной поверхности и интернализуются клетками разных типов, увеличивая их протективный потенциал. Эти протеины обладают также выраженными иммуномодулирующими свойствами.

Мы провели сравнительное исследование интенсивности адсорбции экзогенных БТШ70 на поверхности живых, апоптозных и фиксированных лимфоцитов. В опытах использовали биотинилированные рекомбинантные БТШ70, тимоциты и спленоциты мыши, а также клетки мышиной лимфомы EL4. Было обнаружено, что апоптозные лимфоциты, а также клетки, префиксированные формальдегидом, характеризуются значительно более высоким уровнем адсорбции экзогенных БТШ70 по сравнению с живыми клетками. Зарегистрированная ярко выраженная аффинность экзогенных БТШ70 к клеткам, экспонирующим на своих плазматических мембранах денатурированные протеины (фиксированные формальдегидом) и к поверхности апоптозных клеток, позволяет предположить, что внеклеточные циркулирующие БТШ70 могут являться для иммунной системы своеобразным маркером клеток, подлежащих элиминации. Действительно, хорошо известно, что клетки-мишени, на поверхности которых представлены БТШ70, распознаются и элиминируются цитотоксическими эффекторами иммунной системы. Указанные данные явились основанием для предположения о вовлеченности поверхностных БТШ в систему иммунологического надзора. В соответствии с этим, наши данные свидетельствуют о том, что одной из функций внеклеточного пула БТШ70 является выявление клеток, подлежащих элиминации эффекторами иммунной системы.

ВЛИЯНИЕ ПИРОГЕНАЛА НА СОСТОЯНИЕ НЕРВНОЙ И ИМУННОЙ СИСТЕМЫ МЫШЕЙ С РАЗНЫМ ИСХОДНЫМ УРОВНЕМ ОРИЕНТИРОВОЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКОГО ПОВЕДЕНИЯ

Артамонов С.А., Колесников О.Л.

НИИ Иммунологии Челябинской государственной медицинской академии, Челябинск, Россия

Введение. Накопленные за последние десятилетия данные позволяют говорить о совместном функционировании иммунной и нервной систем в процессе выполне-

ния базисных функций организма. У животных высшую нервную деятельность оценивают, в частности, по ориентировочно-исследовательскому поведению. Оно позволяет животному изучать окружающую среду и нормально в ней функционировать. В литературе недостаточно данных о том, как влияют иммунномодулирующие препараты на нервную систему, особенно при разном типе ВНД.

Поэтому целью работы является оценка влияния пирогенала на поведение мышей с различным исходным уровнем ориентировочно-исследовательского поведения (УИП), а также выявление взаимосвязей между состоянием иммунной и нервной систем.

Материалы и методы. В эксперименте использовались беспородные мыши весом 24-26 г. Препарат вводился в дозе 13,5 мкг/кг веса животного трехкратно, внутримышечно, через сутки. Состояние иммунной системы оценивалось по реакции ГЗТ на эритроциты барана, введенные в дозе 10^8 клеток в брюшную полость через двое суток после окончания курса введения препарата. Разрешающая доза эритроцитов барана вводилась под апоневроз задней лапы через 72 часа после иммунизации. В контрольную лапу вводился физиологический раствор. Реакция оценивалась через 24 часа по коэффициенту интенсивности, равному К=((Вес опытной лапы - Вес контрольной лапы)/Вес контрольной)*100%. Также измерялась масса селезенки и тимуса и подсчитывалось количество ядросодержащих клеток в этих органах. Поведение оценивалось с помощью теста «Открытое поле» (M.L. Weisher, 1976). Полученные результаты обработаны статистически с использованием лицензионного пакета прикладных программ STATISTICA 6.0. Данные представлены в виде средней величины ± стандартного отклонения. Для разделения животных на группы по степеням активности применялся кластерный анализ. При определении различий между группами использовались непараметрические критерии Манна-Уитни (MU) и критерий серий Вальда-Вольфовица (WW). Для оценки связей между показателями иммунной и нервной систем использовались методика оценки корреляции Спирмена. Результаты представлены в таблице. Вынесены достоверные различия.

Результаты. По характеру поведения мыши разделяются на три типа с высокой, средней и низкой активностью.

Вывод. Из таблицы видно, что пирогенал не одинаково влияет на животных с разным уровнем ориентировочно-исследовательского поведения. У животных с низким УИП препарат увеличивает показатели по сравнению с контролем, у мышей со средним - не изменяет, у животных с высоким УИП наблюдается снижение некоторых параметров. Интересен тот факт, что изменение в показателях иммунной системы наблюдается только у животных с низким УИП. Анализ корреляционных взаимосвязей показывает, что у животных с низким и средним УИП наблюдается прямая связь горизонтальной активности и количества лимфоцитов крови (K_S=0,9, P=0,03).

Заключение. Применение пирогенала по-разному влияет как на нервную, так и на иммунную системы животных в зависимости от исходного УИП. Указанный эффект может иметь значение и в медицинской практике.

ВЛИЯНИЕ ГЛЮКОКОРТИКОИДОВ НА СИСТЕМУ ТУЧНЫХ КЛЕТОК

Арташян О.С., Мухлынина Е.А.

Уральский государственный университет им. А.М. Горького, Екатеринбург, Россия

Мастоциты – это полифункциональные клетки, широко представленные практически во всех органах и тканях. Они участвуют в развитии воспалительных, иммунных, аллергических реакций, выделяя разнообразные биологически активные вещества. Данные последних лет позволяют высказать гипотезу о возможности образования ими единой самостоятельной регуляторной системы. Тучные клетки в силу своего ключевого положения в комплексе тканей внутренней среды должны находиться под контролем интегрирующих систем организма, в первую очередь, нервной и эндокринной. Но, несмотря на интенсивное изучение мастоцитов, вопросы о месте тучных клеток в иерархии данных регуляторных систем, о механизмах действия тучных клеток в разных тканях не раскрыты до сих пор.

Целью нашего исследования было изучение влияния гормонов коры надпочечников на состояние морфофункциональной активности системы тучных клеток в различных тканях (печень, кишечник, желудок, тимус, кожа, надпочечники).

Нами были поставлены следующие задачи:

1. Оценить количество тучных клеток в тканях после введения преднизолона;

2. Оценить степень дегрануляции тучных клеток и определить их функциональную активность в тканях после введения преднизолона.

Материалы и методы. В качестве модели для изучения действия кортикоидов на мастоциты использовалось введение преднизолона. Это синтетический глюкокортикоидный препарат, по противовоспалительной активности превосходящий гидрокортизон в 4 раза. Работа выполнена на 20 белых беспородных крысах-самцах массой 150-200 граммов. Животные содержались в условиях лабораторного вивария. Ежедневно на протяжении 4 недель внутрибрюшинно крысам вводился преднизолон в дозе 12 мг/кг. Затем был произведен забор материала. Для гистологического исследования и оценки морфофункциональной активности тучных клеток у животных забирали печень, кишечник, желудок, тимус, кожу, надпочечники. Для выявления тучных клеток срезы окрашивали толуидиновым синим и азуром. Плотность тучных клеток определялась при увеличении в 400 раз в 20 полях зрения, S=0,01 мм^2. Оценку функциональной активности тучных клеток проводили методом подсчета коэффициента дегрануляции.

	Контроль	Пирогенал	P
Низкий уровень ориентировочно-исследовательского поведения (Контроль N=6, Пирогенал N=6)			
Горизонтальная активность перед иммунизацией	28,83±11,51	38,00±24,75	0,015(WW)
Стойка с упором перед забоем	3,83±2,64	10,00±5,48	0,03(MU)
ЯСК селезенки/массу селезенки, (*10^6/мг)	1,15±0,23	2,05±0,96	0,015(WW)
Высокий уровень ориентировочно-исследовательского поведения (Контроль N=4, Пирогенал N=5)			
Стойка с упором перед иммунизацией	14,00±7,21	3,60±4,93	0,04(MU)

Полученные результаты. Проведенные морфометрические исследования показали, что количество тучных клеток в печени после введения преднизолона достоверно увеличивается по сравнению с контролем в 3,2 раза (с 0,82±0,19 до 2,60±0,62*), напротив, коэффициент дегрануляции значимо уменьшается в 7,4 раза (с 15,29±4,10 до 2,07±1,13*). Это объясняется увеличением количества функционально не активных клеток. В кишечнике в ответ на воздействие происходит достоверное увеличение количества мастоцитов в 3,2 раза (с 0,67±0,06 до 2,12±0,33*), коэффициент дегрануляции при этом практически не изменяется, уменьшается в 1,2 раза (с 7,71±3,94 до 6,59±3,03). Количество тучных клеток в желудке увеличивается по сравнению с контролем в 8,8 раза (с 0,65±0,17 до 5,72±1,21*), что сопровождается незначительным уменьшением их дегрануляции в 1,4 раза (с 7,97±1,43 до 5,77±1,90). При действии преднизолона количество тучных клеток в тимусе практически не изменяется, равно как и коэффициент дегрануляции. Полученные данные свидетельствуют, что количество мастоцитов в коже уменьшается незначительно по сравнению с контролем (с 13,27±2,33 до 10,24±0,96). Однако коэффициент дегрануляции при этом достоверно возрастает в 10 раз с 2,60±0,72 до 26,11±2,36*. Введение преднизолона вызывает увеличение количества тучных клеток в надпочечниках в 5,7 раза (с 1,06±0,17 до 6,02±1,18*). Коэффициент дегрануляции в надпочечниках при воздействии достоверно не изменяется (в контроле 5,66±2,47, преднизолон 9,07±2,51).

Таким образом, после введения преднизолона во всех изученных тканях, за исключением тимуса, наблюдаются изменения со стороны тучноклеточной популяции, которое выражается в увеличении секреции биологически активных веществ мастоцитами. Это достигается разными путями: в одних органах (печень, желудок, кишечник, надпочечники) увеличивается общее содержание тучных клеток, вероятно, за счет притока из других тканей, без увеличения их функциональной активности. А в других тканях (кожа), напротив, возрастает секреторная активность мастоцитов без достоверных количественных изменений.

СУБМИКРОСКОПИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА АЛЛЕРГИЧЕСКОЙ АЛЬТЕРАЦИИ

Бархина Т.Г., Черных А.С.

ГУ НИИ морфологии человека РАМН, Москва, Россия

Заболеваемость, вызванная различными аллергическими агентами, с каждым годом имеет тенденцию к увеличению. Динамика аллергических поражений связана как с клеточными, так и с субклеточными механизмами. Точки приложения различных аллергенов и их взаимосвязь с органеллами клетки может быть прослежена только с помощью изучения экспериментальных моделей, что и явилось целью настоящей работы.

Материал и методы. Экспериментальными животными служили морские свинки, которым были введены гетерологичные кроличьи антитела к различным клеточным органеллам: митохондриальные, лизосомальные, микросомальные, вызывающие клеточные аллергические реакции. Модель воздействия была разработана совместно со старшим научным сотрудником В.А.Томильцом. С помощью метода электронной микроскопии исследованы различные клетки печени, тонкой и толстой кишки.

Результаты. При экспериментальной аллергической альтерации выявлены значительные изменения в различных популяциях клеток. В большей степени повреждаются гепатоциты, клетки Купфера, каемчатые клетки кишки, лимфоциты, плазмоциты, фибробласты собственной пластинки слизистой оболочки (СПСО) тонкой кишки. Это подтверждается изменениями как в мембранах клеток (в плазмалемме и в нуклеолемме), так и в органеллах.

При введении антимитохондриальных антител (МХА) обнаруживаются следующие изменения: микровезикуляция цитоплазмы, полиморфизм изменений митохондрий (деструкция крист, увеличение количества кальциевых преципитатов, появление миелиноподобных, кристаллоидных и кольцевидных телец, гомогенизация матрикса). Изменения митохондрий в большей степени характеризуют повреждения гепатоцитов. Наряду с этим резко уменьшается количество гранул гликогена и усиливается отек цитоплазмы.

Введение гетерологичных антилизосомальных и антимикросомальных антител ведет в основном к изменениям гранулярного эндоплазматического ретикулума, лизосом и нарушениям ядерно-цитоплазматических взаимоотношений. Все эти изменения свидетельствуют о серьезных внутриклеточных перестройках.

Заключение. Наши исследования показали, что в ответ на моделирование аллергической альтерации в клетках изученных органов наступают деструктивные процессы, которые ведут к значительным метаболическим перестройкам.

Коррекция этих состояний может быть достигнута только при улучшении всех видов обмена с помощью различных метаболиков.

РОЛЬ ЛИМФОЦИТОВ В1 ПРИ ВАКЦИНАЦИИ BCG МЫШЕЙ CBA/N-XID

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

ГУ ЦНИИ Туберкулеза РАМН, Москва, Россия

Туберкулез до настоящего времени остается одним из наиболее опасных инфекционных заболеваний, приводящих к гибели взрослого населения. Полученная ещё в начале двадцатого века вакцина BCG достаточно эффективна против туберкулёзного менингита и диссеминированного туберкулёза и широко используется для вакцинации детей. При этом уровень защиты взрослых колеблется от 0 до 80% в различных популяциях, что может указывать на генетический контроль этого показателя.

При туберкулёзе преимущественно развивается иммунный ответ клеточного типа, в котором участвуют Т-лимфоциты, макрофаги и нейтрофилы. Роль В-лимфоцитов в формировании протективного иммунитета изучена очень слабо. Среди В-лимфоцитов выделяют две популяции: В1 и В2. Поскольку клетки В1 находятся преимущественно в перитонеальной и, главное, плевральной полостях, они представляют особый интерес при изучении туберкулёза.

Целью данного исследования было изучить роль лимфоцитов B1 при вакцинации BCG и последующем заражении мышей вирулентным штаммом *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv.

Данная работа выполнена на мышах инбредных линий CBA и CBA/N. Генетически мыши линии CBA/N отличаются от родительской линии CBA точечной мутацией xid (X-linked immunodeficiency), приводящей к нарушению дифференцировки B-лимфоцитов. У мышей CBA/N сильно редуцирован весь ряд B-клеток, что позволяет рассматривать их, как возможную экспериментальную модель для изучения B-клеточного компонента в действии вакцины BCG. Ранее в нашей лаборатории было установлено, что мыши CBA/N не отличаются от линии CBA по устойчивости к первичной туберкулезной инфекции. В отличие от мышей CBA, мыши CBA/N не вакцинируются BCG, сохраняя первичный уровень чувствительности к заражению вирулентным штаммом *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv. Однако вакцинация мышей обеих линий соникатом микобактерий в неполном адъюванте Фрейнда индуцировала защиту от туберкулёза.

Различают две субпопуляции клеток B1: B1a(CD5+) и B1b(CD5-). Обе субпопуляции формируются в основном в процессе эмбриогенеза в красном костном мозге (ККМ) и печени, но лимфоциты B1a не образуются *de novo* у взрослых животных. Для изучения роли лимфоцитов B1a в формировании протекции при вакцинации мы выделяли клетки печени эмбрионов мышей CBA на 15-17 день пренатального развития и вводили их внутривенно реципиентам CBA/N в количестве 10 млн/мышь. Через 4 недели мышей вакцинировали подкожно BCG ($2x10^7$ КОЕ). Спустя 5 недель после вакцинации животных заражали внутривенно вирулентным штаммом *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv $5x10^6$ КОЕ. Среднее время выживания (СВВ) зараженных вакцинированных и невакцинированных мышей CBA/N составляло 29±2 дня. В то же время вакцинированные и зараженные мыши линии CBA/N, которым предварительно были введены клетки эмбриональной печени CBA, имели СВВ 44±2 дня.

Поскольку лимфоциты B1b формируются в ККМ, для восстановления популяции этих клеток у мышей CBA/N были созданы радиационные костномозговые химеры. Для этого мышей CBA/N летально облучали, и восстанавливали клетками КМ CBA или CBA/N (в качестве контроля) в количестве $2x10^7$ клеток на мышь. Через 6 недель химер вакцинировали BCG ($2x10^7$ КОЕ), и ещё через 5 недель всех животных заражали микобактериями, как описано выше. Оказалось, что продолжительность жизни вакцинированных и зараженных мышей-химер CBA→CBA/N была также на 2 недели больше по сравнению с контрольными химерами CBA/N→CBA/N.

Показано также, что при восстановлении популяции клеток B1 у мышей CBA/N высеваемость микобактерий из легких зараженных животных уменьшалась более чем в 50 раз ($<10^6$ и $(4,5\pm1,2)x10^7$ КОЕ для CBA/N→CBA/N и CBA→CBA/N соответственно).

Таким образом, восстановление популяции B1-лимфоцитов у мышей CBA/N-xid приводит к тому, что вакцинация их BCG становится более эффективной. Это выражается в увеличении продолжительности их жизни, а также уменьшении КОЕ в легких и селезёнке при вакцинации BCG и последующем заражении вирулентным штаммом *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv.

ОЦЕНКА ДЕЙСТВИЯ ИММУНОМОДУЛЯТОРОВ НА ХЕМИЛЮМИНЕСЦЕНЦИЮ НЕЙТРОФИЛОВ *IN VITRO*

Биргер О.В., Заколяпин П.А., Зурочка А.В., Яковлева Ю.А., Артемьев И.Н., Погодин Д.В., Зурочка В.А.

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

Изучали возможность применения хемилюминесцентного анализа с использованием анализатора Zenyth 1100 для оценки действия различных иммуномодуляторов *in vitro*. Исследовали влияние нуклеината натрия, галавита, парлазола, бестима, циклоферона, полиоксидония на хемилюминесценцию (ХЛ) нейтрофилов условно-здоровых доноров и больных атопическим дерматитом (АД).

Исследования показали, что все изучаемые препараты обладали в норме прооксидантным действием на хемилюминесценцию нейтрофилов. У больных атопическим дерматитом отмечалась индивидуальная чувствительность нейтрофилов к иммуномодулирующим препаратам. Так только лишь у части исследуемых пациентов нуклеинат натрия и галавит стимулировали хемилюминесценцию нейтрофилов, или не оказывали никакого влияния на эту функцию фагоцитов. Остальные исследуемые иммуномодуляторы чаще не влияли на хемилюминесценцию нейтрофилов или незначительно снижали активность этих клеток. По-видимому, у больных АД выявляется индивидуальная чувствительность к воздействию иммуномодуляторов *in vitro* на хемилюминесценцию нейтрофилов.

ИЗУЧЕНИЕ РОЛИ ИНТЕРЛЕЙКИНА 7 В РЕПЛИКАЦИИ ВИЧ-1 *IN VITRO*

Бойчук С.В.[1], Мустафин И.Г.[2], Макарова М.В.[2], Дунаев П.Д.[1]

[1]Казанский государственный медицинский университет,

[2] Республиканский центр по профилактике и борьбе со СПИД МЗ РТ, Казань, Россия

Целью исследования явилось изучение способности IL-7 индуцировать репликацию ВИЧ-1 в CD4+ Т лимфоцитах (Лф), инфицированных *in vitro*, а также изучение взаимосвязи между процессами репликации ВИЧ-1 в Лф и их активации.

Материалы и методы . Источником ВИЧ-1 являлась плазмида pNL4-3 (AIDS Res.Reagent & Ref. Program). Лф выделяли из периферической крови доноров, серонегативных по ВИЧ-1. Популяцию Лф, не экспрессирующих активационные маркеры (DR, CD25 и 69), получали методом отрицательной иммуномагнитной селекции (Dynal). Неактивированные Лф инкубировали с различными концентрациями IL-7 (R&D Systems) в течение 14 дней в среде RPMI 1640 с добавлением L-глутамина, антибиотиков, эмбриональной телячьей сыворотки (Sigma). Инфицирование Лф осуществляли непосредственно перед внесением IL-7. Репликацию ВИЧ-1 оценивали методом ИФА (Bio-Rad), определяя содержание $p24^{gag}$ в супернатантах культур Лф. Количество Лф, инфицированных ВИЧ-1, определяли методом проточной цитометрии (FACsCalibur) с помощью моноклональных АТ к $p24^{gag}$ антигену (Coulter), определяемому внутриклеточно. Влияние IL-7 на активационный статус Лф оценивали методом проточной цитометрии по экспрессии ранних и по-

здних маркеров активации (CD69, 71, DR, 25). Пролиферацию Лф оценивали по снижению интенсивности флуоресценции CFSE (Molecular Probes) методом проточной цитометрии. В контрольных сериях экспериментов осуществляли культивирование инфицированных Лф без IL-7, а также культивирование неинфицированных Лф с IL-7.

Результаты. Культивирование Лф с IL-7 дозозависимо приводило к их активации и индуцировало их пролиферацию. Пик репликации ВИЧ-1 в культурах Лф, культивированных в присутствии IL-7, наблюдался на 7-8 сутки культивирования. В контрольной серии экспериментов (культивирование инфицированных Лф без IL-7) Лф не экспрессировали активационные маркеры на протяжении всего периода культивирования, а уровень $p24^{gag}$ антигена ВИЧ-1 в супернатантах данных культур Лф был ниже порога чувствительности используемой системы. Спонтанной пролиферации Лф, культивированных без IL-7, также не наблюдалось. Уровень репликации ВИЧ-1 в культурах инфицированных Лф, культивированных в присутствии IL-7, положительно коррелировал с количеством клеток, позитивных по $p24^{gag}$. Проведение многоцветного анализа выявило, что популяция "продуктивно инфицированных" Лф (содержащих внутриклеточный $p24^{gag}$ антиген) является гетерогенной. Помимо традиционной популяции клеток, являющейся активированной и продуцирующей ВИЧ-1 (DR^+, 25^+ $p24^{gag+}$), обнаружена популяция Лф, не экспрессирующая маркеры активации (CD25, 69, 71 и DR^-), но в то же время являющаяся продуцентом ВИЧ-1 ($p24^{gag+}$). Было выявлено отсутствие прямой зависимости между пролиферативным ответом Лф в ответ на стимуляцию IL-7 и их способностью продуцировать ВИЧ-1. Обнаружено, что клетками-продуцентами ВИЧ-1 ($p24^{gag+}$), могут являться непролиферирующие Лф ($CFSE^-$).

Выводы. 1) Обнаружена способность IL-7 активировать покоящиеся Лф периферической крови и индуцировать в них репликацию ВИЧ-1, что может отчасти объяснить выявленный рядом исследователей факт положительной корреляции между содержанием данного цитокина в сыворотке ВИЧ-инфицированных больных и прогрессированием заболевания. 2) Результаты исследования свидетельствуют об отсутствии прямой зависимости между процессами репликации ВИЧ-1 в Лф и уровнем их активации и пролиферации, определяемыми традиционными методами.

РОЛЬ ЭНДОТЕЛИАЛЬНЫХ КЛЕТОК (ЭК) В РЕГУЛЯЦИИ АПОПТОЗА НЕИНФИЦИРОВАННЫХ И ИНФИЦИРОВАННЫХ $CD4^+$ ЛИМФОЦИТОВ (ЛФ)

Бойчук С.В.[1] , Мустафин И.Г. [2], Макарова М.В.[2]

[1]Казанский государственный медицинский университет,
[2] Республиканский центр по профилактике и борьбе со СПИД МЗ РТ, Казань, Россия

Целью исследования явилось изучение восприимчивости к апоптозу у различных популяций CD4+ Лф, инфицированных ВИЧ-1 *in vitro*, при их культивировании с ЭК.

Материалы и методы. Лф выделяли из периферической крови доноров, серонегативных по ВИЧ-1 на градиенте плотности Фиколл-Пака (Pharmacia) с последующей элиминацией активированных Лф, экспрессировавших ранние и поздние маркеры активации методом позитивной иммуномагнитной селекции (Dynal). Неактивированные Лф культивировали с ЭК в течение 14 дней в среде RPMI 1640 с добавлением L-глутамина, антибиотиков, эмбриональной телячьей сыворотки (Sigma). Источником ВИЧ-1 являлась плазмида pNL4-3 (AIDS Res.Reagent & Ref. Program). Инфицирование Лф осуществляли сразу же после их внесения к культуре ЭК. Репликацию ВИЧ-1 оценивали методом ИФА (Bio-Rad), определяя содержание $p24^{gag}$ в супернатантах культур Лф. Количество Лф, являющихся продуцентами ВИЧ-1, определяли методом проточной цитометрии (FACsCalibur) с помощью моноклональных АТ к $p24^{gag}$ антигену (Coulter). Апоптоз Лф оценивали методом проточной цитометрии с помощью специфических флуорохромов по изменению величины митохондриального потенциала (CMX-Ros и DiOC6(3)), появлению экспрессии на наружной мембране молекул фосфатидилсерина (Annexin V и MC540) и фрагментации ДНК (PI и 7-ADD). В контроле осуществляли культивирование двух типов клеток по отдельности, а также в условиях проведения инфицирования и без него. Пролиферативный ответ Лф оценивали по снижению интенсивности флюоресценции CFSE, а активационный статус - по появлению маркеров активации и секреции IL-2 в супернатантах культур Лф.

Результаты. Было выявлено, что культивирование неактивированных Лф с ЭК приводит к появлению пролиферативного ответа Лф и их активации, сопровождающейся появлением экспрессии ранних и поздних маркеров активации и секрецией IL-2. Спонтанная активация и пролиферация Лф, культивированных без ЭК, не регистрировались. Инфицирование Лф, культивированных с ЭК, не приводило к выраженным различиям в характере пролиферативного ответа и активационного статуса Лф по сравнению с контролем (неинфицированные культуры ЭК/Лф). Проведение многоцветного анализа показало, что клетками-продуцентами ВИЧ-1 являлись исключительно неактивированные и непролиферирующие Лф. В то же время, количество клеток, подвергающихся апоптотической гибели, среди "продуктивно инфицированных" Лф (содержащих внутриклеточный $p24^{gag}$ антиген) в присутствии ЭК было существенно ниже по сравнению с неинфицированной популяцией Лф ($p<0,001$).

Выводы. Несмотря на то, что ЭК обладают способностью активировать Лф периферической крови и вызывать их пролиферацию, репликация ВИЧ-1 активно происходит только в клетках, не обладающих вышеуказанными признаками. Кроме того, клетки-продуценты ВИЧ-1 обладают выраженной устойчивостью к процессам программированной клеточной гибели по сравнению с неинфицированной популяцией Лф. Логично предположить, что устойчивость "продуктивно инфицированных" Лф является следствием их минимальной активации, индуцируемой ЭК. Этот факт свидетельствует также о том, что процессы репликации ВИЧ-1 в Лф и их активации и пролиферации могут не быть сопряженными друг с другом.

ИНТЕРЛЕЙКИН 7 (IL-7) СПОСОБЕН МОДУЛИРОВАТЬ ПРОЦЕССЫ АПОПТОЗА НЕИНФИЦИРОВАННЫХ И ИНФИЦИРОВАННЫХ ВИЧ-1 ЛИМФОЦИТОВ

Бойчук С.В.[1], Мустафин И.Г. [2] , Макарова М.В.[2] , Дунаев П.Д.[1]

[1]Казанский государственный медицинский университет,
[2] Республиканский центр по профилактике и борьбе со СПИД МЗ РТ, Казань, Россия

Целью исследования явилось изучение способности IL-7 регулировать процессы спонтанного апоптоза CD4+

Т лимфоцитов (Лф), инфицированных ВИЧ-1 *in vitro*, а также изучение чувствительности к апоптозу различных популяций Лф (инфицированных и неинфицированных), культивированных в присутствии IL-7.

Материалы и методы. Мононуклеары выделяли из периферической крови доноров, серонегативных по ВИЧ-1 на градиенте плотности Фиколл-Пака (Pharmacia) и инкубировали с различными концентрациями IL-7 (R&D Systems) в течение 14 дней в среде RPMI 1640 с добавлением L-глутамина, антибиотиков, эмбриональной телячьей сыворотки (Sigma). Источником ВИЧ-1 являлась плазмида pNL4-3 (AIDS Res.Reagent & Ref. Program). Инфицирование мононуклеаров осуществляли непосредственно перед внесением IL-7. Репликацию ВИЧ-1 оценивали методом ИФА (Bio-Rad), определяя содержание $p24^{gag}$ в супернатантах культур Лф. Количество Лф, инфицированных ВИЧ-1, определяли методом проточной цитометрии (FACsCalibur) с помощью моноклональных АТ к $p24^{gag}$ антигену (Coulter), определяемому внутриклеточно. В контрольных сериях экспериментов осуществляли культивирование инфицированных Лф без IL-7, а также культивирование неинфицированных Лф с IL-7. Апоптоз Лф оценивали методом проточной цитометрии с помощью специфических флуорохромов по изменению величины митохондриального потенциала (CMX-Ros и DiOC6(3)), появлению экспрессии на наружной мембране молекул фосфатидилсерина (Annexin V и MC540) и фрагментации ДНК (PI и 7-ADD).

Результаты. Было выявлено, что культивирование мононуклеаров в присутствии IL-7 способствует увеличению их выживаемости *in vitro* и способствует снижению количества клеток, подвергающихся спонтанному апоптозу. Эффект IL-7 был дозозависимым. Инфицирование культуры Лф в отсутствие IL-7 индуцировало значительное снижение количества CD4+ Лф к 8-10 суткам культивирования ($p<0,01$), даже несмотря на то, что количество ВИЧ-инфицированных клеток и уровень репликации ВИЧ-1 были чрезвычайно низкими. Следовательно, подавляющее число клеток, гибнущих по механизму апоптоза, составляли неинфицированные CD4+ Лф. В то же время, количество CD8+ Лф оставалось стабильным на протяжении всего периода культивирования. Внесение ВИЧ-1 в культуру мононуклеаров, культивированных в присутствии IL-7, индуцировало репликацию ВИЧ-1 и приводило к существенному увеличению количества инфицированных клеток ($p<0,001$). IL-7 также оказывал существенное влияние на процессы апоптоза как инфицированных, так и неинфицированных клеток. Было выявлено, что IL-7 способствует значительному повышению выживаемости неинфицированных Лф ($p<0,01$). В то же время, количество клеток, подвергающихся апоптотической гибели, среди "продуктивно инфицированных" Лф (содержащих внутриклеточный $p24^{gag}$ антиген) в присутствии IL-7 было существенно ниже по сравнению с неинфицированной популяцией Лф ($p<0,001$).

Выводы. 1) Инфицирование *in vitro.* Лф периферической крови инициирует процессы их апоптоза; 2) Наиболее чувствительной популяцией Лф, подверженной апоптотической гибели, является пул неинфицированных или латентно инфицированных Лф. 3) Лф, активно продуцирующие вирус, являются устойчивыми к апоптозу. 4) IL-7 обладает способностью инициировать процессы репликации ВИЧ-1 в Лф и обеспечивать их резистентность к апоптозу "клеток-продуцентов ВИЧ-1", обеспечивая тем самым персистирование инфекции и прогрессирование заболевания.

ИЗУЧЕНИЕ ИММУНОМОДУЛИРУЮЩЕЙ АКТИВНОСТИ «КАСКАТОЛА» И СЕЛЕНИТА НАТРИЯ

Болиева Л.З., Сергеев А.В.[1]

Северо-Осетинская государственная медицинская академия;

[1]ГУ РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН, Москва

Роль витаминов и микронутриентов в поддержании гомеостаза организма исключительно велика. При этом как недостаточное содержание в организме, так и применение высоких доз указанных средств может оказать серьезное влияние на течение иммунологических реакций. Несмотря на значительное число проведенных исследований, влияние большинства микронутриентов на иммуногенез окончательно не определено. Особый интерес представляет изучение возможности использования микронутриентов для коррекции вторичного иммунодефицита, развивающегося при проведении химиотерапии злокачественных новообразований.

Целью исследования явилось изучение иммуномодулирующей активности «Каскатола» и селенита натрия в условиях вторичного иммунодефицита, индуцированного цитостатиком аранозой.

Материалы и методы. Эксперимент проводился на мышах линий BALB/c и C3H массой 18-22 г, полученных из питомника «Столбовая» РАМН и разводки вивария ОНЦ РАМН. Животные содержались в стандартных условиях на стандартном рационе вивария и получали питьевую воду без ограничений.

Исследуемые препараты:

- «Каскатол» (ОАО «Холдинг «ЭДАС» по лицензионному соглашению с ГУ РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН) – витаминный комплекс, содержащий в 1 драже бета-каротина 2,5 мг, витамина Е 12,5 мг, аскорбиновой кислоты 25 мг;

- «Неоселен» (НПЦ «Исинга», г.Чита) – 0,05% нейтральный раствор селенита натрия, содержащий 230 мкг селена в 1 мл.

Исследуемые препараты вводили животным в течение 8 недель.

Иммунодепрессию индуцировали по оригинальной методике четырехкратным с интервалом 4 дня внутривенным введением цитостатика аранозы в разовой дозе 200 мг/кг массы тела. Животные были разделены на четыре группы. При этом мыши 1-й группы служили интактным контролем, животные 2-й группы получали только аранозу, мыши 3-й группы получали одновременно с аранозой «Каскатол» по 4 драже/кг массы тела; 4-й группе мышей скармливали «Каскатол» по 2 драже/кг массы тела в комбинации с селенитом натрия по 1 мг/л воды.

Иммуномодулирующую активность оценивали по влиянию на пролиферативный ответ и цитотоксическую активность лимфоцитов в смешанной культуре лимфоцитов (СКЛ). Исследования проводили на 2, 4, 6, 8 и 10 неделях опыта.

Результаты. В условиях проведенного эксперимента введение аранозы приводило к постепенному снижению пролиферативной активности спленоцитов в 1,5-3 раза ($p<0,05$) со 2-й до 8-й недели опыта, снижению в те же сроки цитотоксической активности Т-лимфоцитов в 1,6-2,6 раза ($p<0,05$). «Каскатол» при одновременном с аранозой введении оказывал стимулирующее влияние, начиная с 4-й недели эксперимента, и повышал пролиферативную ак-

тивность Т-лимфоцитов в 2,3 раза (p<0,05), цитолитическую активность в 1,5 раза (p<0,05) к 8-й неделе опыта. Применение комбинации «Каскатола» с селенитом натрия оказывало выраженное корригирующее действие на функциональную активность Т-лимфоцитов, сохраняя их пролиферативный и цитотоксический потенциал и препятствуя развитию иммунодепрессии, индуцированной аранозой.

Заключение. Результаты проведенного исследования подтверждают имеющиеся к настоящему времени данные об иммуномодулирующей активности витаминов Е, С, бета-каротина и селена. Максимальный эффект достигается при комбинированном применении данных микронутриентов. Механизм их стимулирующего влияния на иммунную систему до конца неясен, хотя достаточно аргументированным является предположение о том, что в его основе лежат антиоксидантные свойства исследуемых веществ, препятствующие иммунотоксическому действию продуктов перекисного окисления липидов. Полученные нами данные позволяют рекомендовать применение «Каскатола»с селенитом натрия для коррекции нарушений иммунного статуса при проведении химиотерапии злокачественных новообразований.

ВЛИЯНИЕ ГУМОРАЛЬНЫХ ФАКТОРОВ, ПРОДУЦИРУЕМЫХ ЧЕЛОВЕЧЕСКИМИ ФИБРОБЛАСТАМИ РАЗЛИЧНОЙ ЗРЕЛОСТИ, НА ФУНКЦИОНАЛЬНУЮ АКТИВНОСТЬ ПОЛИМОРФНОЯДЕРНЫХ ЛЕЙКОЦИТОВ

Бурда Ю.Е., Нестеренко С.Н., Шевченко С.М., Леонова И.Ю.

Курская областная клиническая больница, Россия

В последние годы значительно возрос интерес к участию в иммунных и воспалительных реакциях не иммунокомпетентных клеток, в том числе фибробластов. Несмотря на то, что фибробласт является одной из самых распространенных клеток в организме, ему до недавних пор отводилась лишь одна, структурная, функция. Лишь около двух десятилетий назад начали исследовать регуляторную функцию фибробластов. При этом некоторые выявленные факты носят противоречивый характер. Другим аспектом, определяющим значение фибробластов в иммунных и воспалительных процессах и требующим дальнейшего изучения, является функциональная неоднородность популяции фибробластов в целом, и возрастная неоднородность в частности. Движущей силой в изучении данного вопроса является необходимость изучения механизмов «безрубцового» заживления, наблюдающегося в фетальных тканях и исчезающего в постнатальном периоде. Одну из основных ролей в этом процессе отводят фетальным фибробластам, обладающим рядом стойких отличий от фибробластов зрелых [Cassiman J.J. et al., 1977; Broker B.J. et al., 1999; Chin G.S. et al., 2000]. В то же время работы, посвященные экспериментальному изучению влияния гуморальных факторов фетальных и зрелых фибробластов, культивируемых в условиях естественного роста, т.е не подвергающихся каким-либо активационным воздействиям, на функциональную активность иммунокомпетентных клеток носят единичный характер [Бурда Ю.Е. и соавт., 2000, 2002, 2003]. Важность этого аспекта определяется характером изменения количества фибробластов в динамике воспалительного процесса, а именно отсутствием их в период разгара и, соответственно, максимальной концентрации провоспалительных факторов в очаге и нарастанием их числа по мере купирования воспаления. До сих пор нет ответа на вопрос: является ли увеличение доли фибробластов в зоне повреждения к концу воспалительной реакции лишь следствием купирования воспаления или же эти клетки служат одним из его активных регуляторов.

Целью настоящего исследования явилось изучение влияния гуморальных факторов, продуцируемых эмбриональными (ЭФ) и зрелыми легочными (ЗФ) человеческими фибробластами в условиях их стандартного культивирования на функциональную активность полиморфноядерных лейкоцитов (ПЯЛ) *in vitro*. В качестве источника ЭФ служили 7-12-недельные эмбрионы (абортусы). ЗФ получали из здорового участка резецированной по поводу онкологического заболевания легочной ткани. ПЯЛ получали из периферической крови здоровых доноров, выделяя на градиенте фиколл-урографин с с=1,114. Определяли адгезивную способность ПЯЛ, спонтанную и зимозан-индуцированную активность кислой фосфатазы, миелопероксидазы и тест восстановления НСТ в присутствии кондиционированной фибробластами различной степени зрелости среды.

Результаты оценивали на фотометре «УНИПЛАН» (ПИКОН, Россия). При изучении адгезивной способности ПЯЛ получены следующие результаты (n=60, M±σ, в % к максимальной оптической плотности в контрольных лунках): контроль – 95,75±2,71%, ЭФ – 77,53±15,13% (p<0,001), ЗФ – 82,29±13,49% (p<0,001). Спонтанная активность миелопероксидазы составила в контроле 96,56±2,85%, под влиянием супернатанта ЭФ – 114,67±19,80% (p<0,001), под влиянием супернатанта ЗФ – 117,49±18,83% (p<0,001); при стимуляции зимозаном показатели активности миелопероксидазы изменились: контроль – 96,98±3,21%, супернатант ЭФ – 86,10±12,23% (p<0,001), супернатант ЗФ – 86,97±10,97% (p<0,001). Общая выраженность кислородозависимых процессов в ПЯЛ по данным НСТ-теста характеризовалась следующими показателями: контроль – 95,18±3,69%, под влиянием супернатанта ЭФ – 144,70±48,22% (p<0,001), а супернатанта ЗФ – 138,74±51,65% (p<0,001). Стимулированный зимозаном НСТ-тест в контроле составил 94,82±2,40%, при воздействии среды, кондиционированной ЭФ – 100,24±10,53% (p<0,01), а ЗФ – 99,68±10,55% (p<0,01). Выраженность кислородонезависимых микробицидных факторов в ПЯЛ изучалось по активности кислой фосфатазы. В контроле без стимуляции она составила 97,12±2,47%, под воздействием супернатанта ЭФ – 93,77±27,71% (p>0,05), а супернатанта ЗФ – 97,84±14,32% (p>0,05). При стимуляции ПЯЛ зимозаном значимого изменения не произошло: контроль – 96,56±2,76% в присутствии супернатанта ЭФ – 94,84±16,84% (p>0,05), супернатанта ЗФ – 99,31±12,94% (p>0,05).

Таким образом, продуцируемый фибробластами комплекс гуморальных факторов способен оказывать регулирующее действие на функциональную активность полиморфноядерных фагоцитов, подавляя их адгезионную способность и стимулируя активность кислородозависимых механизмов. При этом последнее свойство заметно ослабляется в условиях дополнительного воздействия провоспалительных агентов.

СПОСОБНОСТЬ К ОСТЕОГЕННОЙ И АДИПОГЕННОЙ ДИФФЕРЕНЦИРОВКЕ *IN VITRO* ЗРЕЛЫХ ФИБРОБЛАСТОВ ЗДОРОВОЙ ЛЕГОЧНОЙ ТКАНИ ВЗРОСЛОГО ЧЕЛОВЕКА

Бурда Ю.Е., Нестеренко С.Н., Бондарев В.П., Шевченко С.М., Леонова И.Ю.

Курская областная клиническая больница, Курское областное патологоанатомическое бюро, Россия

На протяжении 10 лет наша лаборатория занимается изучением функциональных свойств фибробластов. Интерес к этой клетке обусловлен рядом ее уникальных свойств. Фибробласт наряду с клетками крови является одной из наиболее распространенных клеток и представлен в строме практически всех органов. Несмотря на это, он остается одной из наименее охарактеризованных в организме клеток. До сих пор ни одна из попыток обнаружить какие-либо уникальные («патогномоничные») свойства фибробласта, как то: морфологические – веретенообразная клетка с низким ядерно-цитоплазматическим отношением, биосинтетические – продукция коллагена, эластина и компонентов неволокнистого межуточного вещества, фенотипические – экспрессия уникальных мембранных, цитоплазматических или ядерных антигенов, биохимические – своеобразие ферментного набора и метаболических процессов – не увенчалась успехом, так как обязательно обнаруживалась другая клетка, частично разделяющая выявленные свойства. Аксиомой является важнейшая роль фибробласта в окончательной фазе воспаления – репарации, однако результат этого процесса может быть совершенно различным - от restitutio ad integrum до формирования грубого гипертрофического или келоидного рубца. Доказана функциональная разнородность общей популяции фибробластов в зависимости от их зрелости и источника происхождения, что позволяет ряду авторов выделять несколько «субпопуляций». Но несмотря на все вышесказанное, даже однозначного определения клетки под названием «фибробласт» на данный момент не существует. Более того, не так давно выявленные мезенхимальные стволовые клетки оказались как морфологически, так и функционально похожими на фибробласт, и каких-либо принципиальных различий между ними пока не установлено. В связи со всем вышесказанным, несомненно, актуальной является необходимость уточнения механизмов участия фибробласта в процессах воспаления и репарации в надежде в перспективе получить инструмент управления этими функциями и моделирования репаративного процесса. Поэтому наша научная работа по изучению свойств данного типа клеток включает два основных направления: с одной стороны, изучение механизмов и результатов взаимодействия фибробластов, полученных из различных тканевых источников, с окружающими клетками и, с другой стороны, исследование их пролиферативно-дифференцировочного потенциала.

В данном случае целью работы явилось изучение способности легочных фибробластов (ЛФ) дифференцироваться *in vitro* в другие клетки мезенхимального происхождения, в частности, в адипоциты и остеоциты. ЛФ получали из здорового участка легкого взрослого донора, удаленного при операции по поводу онкологического процесса, путем механической диссекции ткани и культивирования на среде RPMI-1640:DMEM с добавлением 20% ЭТС и 2 μM/л 2-меркаптоэтанола. После получения монослойной культуры фибробластов с мономорфной характеристикой, проводили их фенотипирование. Для ЛФ установлен следующий фенотип: $CD44^{+}CD90^{+}CD105^{+}$ – 95%, $CD106\ (VCAM\text{-}1)^{+}$ >51%, $CD71^{low}$, $десмин^{low}$, $CD45^{-}\ CD34^{-}$. Для направленной дифференцировки использовали реактивы и протоколы фирмы StemCell Technologies (Канада). При очередном пассаже ЛФ высевали на культуральные чашки Петри диаметром 3,5 см (Nunc, Дания). После получения конфлюентной культуры производили замену среды на соответствующую дифференцировочную. Смену среды производили 1 раз в 2-4 дня на протяжении 21 суток. По окончании этого периода проводили морфологическую и гистохимическую идентификацию культур. В качестве контроля выступала культура ЛФ, культивируемая параллельно на тех же чашках Петри в стандартной среде. В результате клетки, культивированные на остеогенной среде, на 21-е сутки представлены плотно упакованным монослоем, местами – двумя слоями вытянутых фибробластоподобных клеток, образующих вихревые структуры. При окраске ализариновым красным S выявляются очаги отложения кальция оранжево-красного цвета, преимущественно вокруг островков размножения. ЛФ, подвергнутые адипогенной дифференцировке, представлены монослоем фибробластоподобных клеток, поперечные размеры которых больше, чем в контрольной и остеогенной культурах, содержат в цитоплазме диффузно расположенные судан-положительные включения черного цвета. Контрольная культура представлена плотно упакованным монослоем типичных фибробластоподобных клеток, дающих отрицательную реакцию на ализариновый красный S и судан.

Таким образом, ЛФ проявляют определенную пластичность, характерную для мезенхимальных стволовых клеток, что выражается в способности к формированию *in vitro* остеоцитоподобных и адипоцитоподобных клеток. Границы данной пластичности ЛФ будут определены в ходе дальнейшей работы.

СВЯЗЫВАНИЕ СТРЕПТОКОККАМИ ГРУППЫ А ТИПА М12 ИММУННЫХ КОМПЛЕКСОВ: РОЛЬ ДАННОГО СВЯЗЫВАНИЯ В ПАТОГЕНЕЗЕ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО ГЛОМЕРУЛОНЕФРИТА

Бурова Л.А.[1], Гаврилова Е.А.[1], Пигаревский П.В.[1], Нагорнев В.А.[1], Шален К.[2], Тотолян Артем А. [1]

[1] Научно-исследовательский институт экспериментальной медицины РАМН, Санкт-Петербург, Россия;
[2] Отдел лабораторной медицины Лундского Университета, Лунд, Швеция

Нашими исследованиями была выявлена ведущая роль стрептококковых IgG Fc связывающих М подобных белков в инициации экспериментального гломерулонефрита у кроликов. Также установлено, что клинические изоляты стрептококков группы А, рассматривающиеся в качестве этиологического фактора постстрептококкового гломерулонефрита у человека, обладают способностью связывать Fc фрагмент IgG человека. Однако стрептококки группы А типа М12, оцениваемые в качестве нефритогенных штаммов, способны взаимодействовать главным образом с агрегированным, но не с мономерным IgG человека.

Целью данного исследования было изучение механизмов нефритогенной потенции стрептококков типа М12. **Основными задачами** являлись: а) изучение способности референс-штамма стрептококка группы А типа М12 и клинических изолятов того М типа, выделенных от больных острым постстрептококковым гломерулонефритом, связывать искусственно образованные иммунные комплексы; б) исследование способности положительного и отрицательного (по связыванию иммунных комплексов) штаммов стрептококка индуцировать у кроликов экспериментальный гломерулонефрит.

Материалы и методы. В работе использовали референс-штамм стрептококка группы А типа М12 (1800) и 21 клинический изолят стрептококков типа М12, выделенных от больных острым постстрептококковым гломерулонефритом. Клинические изоляты любезно предоставлены доктором Sramek из стрептококковой референс-лаборатории ВОЗ (Прага, Чешская Республика). Для введения кроликам были использованы убитые нагреванием и обработанные 1М раствором KSCN стрептококки по разработанной ранее схеме [Burova L.A., Nagornev V.A.,Pigarevsky P.V. et al. Triggering of renal damage in the rabbit by IgG Fc-receptor-positive group A streptococci. APMIS, 1998; 106:277-87].

Пероксидаза-антипероксидаза (ПАП) иммунные комплексы (ИК) были приготовлены из пероксидазы из корня хрена (тип 1, Sigma Chemical Co) и кроличьей сыворотки против пероксидазы (Dako A/S, Denmark). Связывание стрептококками ПАП комплексов определяли с помощью дот-блота. Тетанус-антитетанус (ТАТ) иммунные комплексы были сконструированы с использованием столбнячного токсоида (SBL Vaccine AB, Sweden) и противостолбнячного IgG человека (Tetagam P, Behringwerke AG, Marburg). Связывание ТАТ комплексов определяли радиоиммунологическим методом, используя столбнячный токсоид, меченный ^{125}I.

Основные результаты. Исследование способности штамма М12/1800 связывать ПАП комплексы, используя различные молярные соотношения антител и антигена (1:1, 1:2, 1:4 и 2:3) при различных значениях pH (5,5, 6,0 или 7,0), показало, что оптимальными являются антитело: антиген соотношение 2:3 и pH 5,5. Именно при этих условиях была проанализирована способность 21 клинического изолята связывать ПАП комплексы. Только два изолята оказались неспособными связывать данные ИК.

Для связывания ^{125}I-ТАТ референс-штаммом оптимальными оказались соотношение антитело:антиген 1:1 и pH 6.0. Большинство исследованных клинических изолятов (19 из 21) были способны связывать 30-40% ТАТ комплексов. Только один штамм 12/305 был негативным по способности связывать оба ИК. Все клинические изоляты и референс-штамм практически не связывали нативные IgG человека и кролика (процент связывания добавленного ^{125}I-IgG не превышал 3,7-5,9).

Почечная ткань от шести кроликов, которым были введены стрептококки М12/1800, М12/257 и М12/305 (первые два штамма положительные, третий – отрицательный по связыванию ИК) с целью индукции экспериментального гломерулонефрита, была подвергнута иммуноморфологическому и гистологическому исследованию. Депозиция IgG и С3 была выявлена на базальной мембране почечных клубочков у четырех кроликов, инъецированных стрептококками М12/1800 и М12/257. У этих же кроликов отмечалась продукция мезангиальными и эндотелиальными клетками провоспалительных цитокинов: IL-1β, IL-6 и TNF-α. При трансмиссионно-электронной микроскопии почечной ткани, полученной от указанных кроликов, были выявлены интенсивные деструктивно-дегенеративные изменения, характерные для мембранозно-пролиферативного гломерулонефрита у больных. Ни у одного из кроликов, получивших инъекции стрептококка М12/305, не наблюдали депозицию IgG и С3, продукцию цитокинов и деструкцию почечной ткани.

Заключение. Таким образом полученные экспериментальные данные указывают на то, что способность стрептококков типа М12 связывать иммунные комплексы может играть важную роль в нефритогенной потенции данного серотипа, наиболее часто выделяемого от больных острым постстрептококковым гломерулонефритом.

ВЛИЯНИЕ НЕЙТРОФИЛОКИНОВ НА ПОПУЛЯЦИОННЫЙ И СУБПОПУЛЯЦИОННЫЙ СОСТАВ ЛИМФОЦИТОВ В ПРОЦЕССЕ ФОРМИРОВАНИЯ ПРОТИВОЧУМНОГО ИММУНИТЕТА

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

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

Введение. В последнее время внимание исследователей привлекают нейтрофилокины (НК) – белковые молекулы нейтрофильного происхождения с м.м. 15-68 кД, обладающие иммунотропным и биологическим действием. Цитокинпродуцирующая активность нейтрофилов (Нф) стала изучаться сравнительно недавно. Ранее нами показана нейтрофилокининдуцирующая активность микробных клеток (м.к.) вакцинного штамма чумного микроба (Васильева и др., 1998).

Цель данной работы – изучение регуляторного действия НК, индуцированных м.к. чумного микроба, на популяционный и субпопуляционный состав лимфоцитов (Лф) в процессе формирования противочумного иммунитета.

Материалы и методы. Исследования выполняли на перитонеальных нейтрофилах (Нф) беспородных мышей, интактных или иммунизированных м. к. *Y. pestis EV* линии НИИЭГ. В качестве индуктора синтеза НК использовали м.к. *Y. pestis EV* в дозе 10 м.к. на Нф, в качестве контроля - 0,15 М раствор NaCl. Длительность инкубирования Нф с указанными препаратами составляла 4 ч. Супернатанты, содержащие естественнный комплекс НК (ЕКНК), получали центрифугированием культур клеток при 1000 g в течение 10 мин с последующим фильтрованием через мембранные фильтры с диаметром пор 0,22 мкм**.** Лф крови выделяли в градиенте фиколл-верографин. Определение состава Лф осуществляли с помощью прямого иммунофлуоресцентного метода и кроличьих антимышиных моноклональных антител к мембранным маркерам $CD3^+$, $CD20^+$, $CD4^+$, $CD8^+$, меченных флуоресцеином. Подсчитывали процент светящихся клеток на 100 Лф.

Основные результаты. Сравнительная оценка состава Лф при первичном и вторичном иммунном ответе выявила, что ЕКНК повышает численность общего пула Лф за счет увеличения абсолютного содержания обеих популяций (Т- и В-клеток). При этом перераспределения относительного содержания этих популяций в суммарном пуле Лф не отмечалось. Анализ количественных изменений основных иммунорегуляторных субпопуляций Т-Лф

($CD4^+$ и $CD8^+$) показал, что ЕКНК вызывает подъем содержания $CD4^+$ Т-Лф и снижение - $CD8^+$ клеток, что приводит, в свою очередь, к увеличению иммунорегуляторного индекса, отражающего соотношение этих субпопуляций ($CD4^+/CD8^+$).

Исследование влияния ЕКНК на популяционный и субпопуляционный состав Лф при вторичном иммунном ответе на *Y. pestis EV* выявило закономерности, аналогичные наблюдаемым при первичном. Следует, однако, отметить, что в первом случае стимулирующий эффект ЕКНК менее значим, так как при вторичном контакте Лф только с антигенами численность их суммарного пула и отдельных популяций, а также удельный вес $CD4^+$ Т-Лф превышают достигаемые при первичном иммунном ответе. Вместе с тем, введение в модельную систему ЕКНК синтезируемого Нф, полученного от иммунных животных, способствует статистически достоверному дополнительному увеличению числа $CD4^+$ Т-Лф. ЕКНК, синтезированный Нф интактных животных, таким эффектом не обладает. Что касается $CD8^+$-Лф, то при вторичном иммунном ответе было отмечено статистически достоверное снижение их количества в сравнении с первичным иммунным ответом, еще более усиливавшееся при добавлении ЕКНК, синтезируемого НФ иммунных животных, и сохранении на уровне контроля с антигенами при использовании ЕКНК интактных Нф.

Заключение. Полученные результаты свидетельствуют об участии ЕКНК в регуляции противочумного иммунитета, в первую очередь, за счет активации Т-хелперов. При этом стимуляция иммунного ответа отмечается под влиянием ЕКНК, синтезируемого Нф, полученными как от иммунизированных, так и от интактных мышей, но в первом случае этот эффект выше.

КОЛОНИЕОБРАЗУЮЩАЯ АКТИВНОСТЬ КЛЕТОК КИШЕЧНИКА

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

ГУ НИИ клинической иммунологии СО РАМН;
[1]ГУ НИИ клинической и экспериментальной лимфологии СО РАМН;
[2]ГУ НИИ физиологии СО РАМН, Новосибирск, Россия

Показано, что клетки эпителия тонкого кишечника обладают способностью к колониеобразованию в селезенке у летально облученных мышей-реципиентов на 8-е сутки (КОЕс-8). Установлено, что на этот процесс оказывает влияние регуляторная сеть цитокинов и ростовых факторов. Известно, что оптимальное для созревания и дифференцировки гемопоэтических предшественников микроокружение формируется в печени на 12 день эмбрионального развития, когда она становится ведущим органом кроветворения.

Целью данной работы было доказать с помощью гистологических, культуральных и генетических методов способность клеток кишечника образовывать гемопоэтические колонии в селезенке облученных мышей, а также изучить возможность регуляции их функциональной активности с помощью кондиционных сред (КС) от клеток эмбриональной печени (КЭП) в период активного кроветворения.

Основные результаты. Установлено, что популяция клеток кишечного эпителия мыши содержит клетки-предшественники, обладающие способностью к образованию селезеночных колоний на 9 сутки (КОЕс-9). С помощью гистологического исследования было показано, что популяция клеток кишечного эпителия мыши образует именно гемопоэтические колонии в селезенке (КОЕс–9) облученных мышей. Для доказательства того, что отдельно взятая колония представляет собой клон клетки кишечного эпителия, мы трансплантировали клетки кишечного эпителия от самцов сингенным летально облученным самкам. Затем, получив суспензию клеток из единичных КОЕс-9, культивировали клетки в полувязкой среде, содержащей метилцеллюлозу. С помощью ПЦР анализа было показано, что полученные через 14 суток *in vitro* гемопоэтические колонии содержали маркер Y-хромосомы. Стоит также отметить, что благодаря радиопротекторной способности клеток кишечника, мыши-реципиенты выживали после трансплантации более 6 месяцев, а потомки клеток кишечной стенки (маркер Y-хромосомы) были обнаружены через 2, 4, 6 месяцев как в гемопоэтических (печень, селезенка, костный мозг), так и в других тканях (кишечник, почки, кожа, легкие).

В следующей серии экспериментов мы попытались изменить способность клеток кишечного эпителия к образованию гемопоэтических колоний с помощью КС, полученных от КЭП в период активного гемопоэза (12 день эмбрионального развития). В результате установлено, что предварительная культивация эпителиальных клеток кишечника мышей-доноров в среде, содержащей 30% кондиционных сред, полученных на 24 и 48 часов, приводит к статистически значимому увеличению их способности образовать гемопоэтические КОЕс-9 по сравнению с контрольной группой в 2,5 раза. При использовании КС от КЭП, полученной на 72 часа, стимулирующего влияния зарегистрировано не было. При проведении опыта с клетками костного мозга (ККМ), было продемонстрировано, что предварительная культивация ККМ в среде, содержащей 30% КС, полученной на 24 часа, приводит к статистически значимому увеличению их способности к образованию КОЕс-9 по сравнению с контрольной группой только в 1,2 раза. Затем мы попытались изменить способность КС от КЭП стимулировать колониеобразующую активность клеток кишечного эпителия. Известно, что такие факторы, как эритропоэтин и IL-1β, регулируют выживание, пролиферацию и дифференцировку клеток-предшественников гемопоэза и, соответственно, могут менять спектр продуцируемых этими клетками медиаторов. В своих исследованиях мы показали, что предварительная культивация клеток кишечника в среде, содержащей 30% КС от КЭП, культивируемых в присутствии эритропоэтина или IL-1β, приводит к отмене стимулирующего эффекта.

В нашей работе также была проведена оценка параметров иммунной системы у летально облученных реципиентов через 1, 3, 6 месяцев после пересадки клеток кишечника. В результате было показано, что у мышей-реципиентов восстановление гуморального иммунного ответа наблюдается уже спустя 3 месяца, а клеточного – через 6 месяцев после трансплантации.

Заключение. Таким образом, полученные нами данные указывают, что клетки кишечника могут образовывать ге-

мопоэтические колонии у летально облученных мышей и эту их способность можно использовать для восстановления гемо-, иммунопоэза, а также регулировать с помощью гуморальных факторов, продуцирующихся КЭП.

БЕЛКИ ТЕПЛОВОГО ШОКА 70 УСИЛИВАЮТ ПРОДУКЦИЮ ГАММА-ИНТЕРФЕРОНА В NK-КЛЕТКАХ

Власкин П.А., Каневский Л.М., Стрельникова Ю.И., Коваленко Е.И.

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

Функциональная активность натуральных киллеров (NK-клеток) регулируется сигналами, поступающими с поверхности клеток-мишеней, и гуморальными факторами, продуцируемыми другими клетками. По данным последних лет, белки теплового шока способны активировать многие клеточные звенья системы врожденного иммунитета. Задачей данной работы явилась оценка влияния белков теплового шока семейства 70 кДа (БТШ70) на продукцию IFN-γ NK-клетками, выделенными из периферической крови человека. Высокоочищенную популяцию NK-клеток получали путем магнитной сепарации фракции мононуклеарных клеток. Продукцию IFN-γ оценивали с помощью иммуноферментного анализа и путем внутриклеточного окрашивания с последующим цитометрическим анализом. Добавление БТШ70 в диапазоне концентраций 0,05-5 мкг/мл само по себе не вызывало продукции IFN-γ неактивированными клетками. В то же время был обнаружен костимулирующий эффект БТШ70 (0,5-5 мкг/мл) на продукцию IFN-γ в NK-клетках, индуцированную цитокинами IL-2 и IL-12. Известно, что БТШ могут связывать липополисахарид (LPS), который взаимодействует с антиген-презентирующими клетками и усиливает продукцию различных цитокинов, что, в свою очередь, может влиять на продукцию IFN-γ NK-клетками. В данной экспериментальной системе добавление к стимулированным IL-2 NK-клеткам LPS (5 нг/мл) приводило лишь к незначительному увеличению продукции IFN-γ. При использовании БТШ70, подвергнутого тепловой обработке (кипячение в течение 15 мин), увеличения продукции не наблюдалось. Для устранения возможного влияния LPS проводилась также обработка NK-клеток полимиксином Б, который способен связывать LPS и предотвращать его взаимодействие с антиген-презентирующими клетками. Указанная обработка не влияла на костимулирующий эффект БТШ70. Также была проведена оценка влияния мембраносвязанных БТШ70 на продукцию IFN-γ NK-клетками с использованием клеток линии К562, у которых поверхностная экспрессия БТШ70 была индуцирована с помощью теплового шока. Инкубация NK-клеток в присутствии обработанных указанным образом клеток К562 в течение 18 часов вызывала увеличение уровня продукции IFN-γ, добавление моноклональных антител, специфичных к БТШ70, приводило к отмене этого эффекта. Таким образом, было показано, что БТШ70, как добавленные экзогенно, так и экспонированные на поверхности опухолевых клеток, оказывают стимулирующее влияние на NK-клетки человека, приводя к увеличению продукции IFN-γ.

Исследования проводятся при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 04-04-49477).

ИНДУКЦИЯ ПРОВОСПАЛИТЕЛЬНЫХ ЦИТОКИНОВ КЛИНИЧЕСКИМИ ШТАММАМИ СТАФИЛОКОККОВ ПРИ МОДЕЛИРОВАНИИ ИНФЕКЦИОННОГО ПРОЦЕССА НА ЛАБОРАТОРНЫХ ЖИВОТНЫХ

Водянова Т.В., Елисеев Ю.Ю., Тихомирова Е.И.[1], Шибаева М.А.[1]

Саратовский государственный медицинский университет, Саратов, Россия;
[1]Саратовский государственный университет имени Н.Г. Чернышевского, Саратов, Россия

Среди возбудителей внутрибольничных инфекций (ВВБИ) лекарственноустойчивые штаммы стафилококков традиционно лидируют. Тяжелое течение вызываемых ими заболеваний определяется как биологическими свойствами возбудителей, так и особенностями ответной реакции организма, в которой значительную роль играют провоспалительные цитокины. При целом ряде инфекционных заболеваний, сопровождающихся бактериальным септическим или бактериальным токсическим шоками, показана чрезмерная продукция некоторых цитокинов, в частности IL-1, TNF-α и IL-6. Установлена ведущая роль IL-1 и TNF-α в патогенезе эндотоксического шока, что послужило основанием для клинического использования при лечении антагонистов и ингибиторов этих цитокинов. В отношении ВВБИ такие данные практически отсутствуют. Для разработки адекватных методов профилактики внутрибольничных инфекций и активации факторов естественной резистентности организма представлялось целесообразным прежде всего оценить индукцию цитокинов в инфекционном процессе, вызываемом ВВБИ.

Материалы и методы. В работе использовали штаммы стафилококков: *Staphylococcus aureus 100 б, S. epidermidis 16, S. haemolyticus 9, S. saprophyticus 6,* выделенных как ВВБИ в клиниках г.Саратова. Данные штаммы характеризовались различной лекарственной устойчивостью. Инфекционный процесс моделировали на беспородных белых мышах-самцах массой 18-20 г введением внутримышечно или внутрибрюшинно взвеси суточных культур клинических штаммов стафилококков в физиологическом растворе в объеме 0,2 мл с концентрацией 5 млн м.к./мл (8 опытных групп по 9 животных), контрольным мышам вводили аналогично 0,2 мл физиологического раствора (2 контрольные группы по 6 животных). Определяли через 1, 6 и 24 ч после заражения содержание в сыворотке крови цитокинов: IL-1, IL-6, IL-8, TNF-α, IFN-γ в ИФА с тест-системами на основе моноклональных антител (наборы реактивов «Цитокиновый тест» АО «Иммунодиагностика» г. Санкт-Петербург).

Результаты. При внутримышечном введении мышам культур клинических штаммов стафилококков *S. epidermidis 16, S. haemolyticus 9* и *S. saprophyticus 6* была отмечена сходная динамика выявления провоспалительных цитокинов IL-1 и IL-6: увеличение содержания относительно контрольных значений через 1 и 6 ч и снижение к 24 ч, не достигающее однако контроля. TNF-α определялся в концентрации, достоверно превышающей контроль, через 24 ч. Аналогичное введение бактерий *S. aureus 100 б* сопровождалось резкой индукцией этих цитокинов до 24 ч наблюдения, содержание IL-1 и TNF-α в 3-5 раз превышало контрольные значения.

При внутрибрюшинном введении мышам *S. epidermidis 16* и *S. haemolyticus 9* содержание IL-1 было достоверно выше контрольных значений через 1, 6 и 24 ч, IL-6 –

через 6 и 24 ч, а TNF-α через 1 ч, после чего оставалось без изменений в последующие часы наблюдения. Введение клинического штамма *S. aureus 100 б* сопровождалось динамичным возрастанием к 24 ч инфекционного процесса одновременно содержания IL-1 и TNF-α, превышающего контроль в 5 – 7 раз, концентрация IL-6 увеличивалась к 6 ч и снижалась к 24 ч, оставаясь при этом выше исходных значений. Интересен факт определения через 6 и 24 ч в сыворотке крови мышей, зараженных культурой *S. aureus 100 б*, IFN-γ и IL-8 в небольших концентрациях (в сыворотках крови контрольных животных и опытных из других групп он не обнаруживался). Внутрибрюшинное введение культуры *S. saprophyticus 6* сопровождалось незначительной индукцией IL-6 и TNF-α через 1 и 6 ч, отмечено снижение концентрации до исходного уровня к 24 ч инфекционного процесса. Особенно выраженной была разница в содержании IL-1 по сравнению с аналогичными данными для других видов стафилококков – достоверно ниже, при этом все же превышая контрольные значения.

Работа выполнена при поддержке гранта министерства образования и науки РФ № 45434 в рамках

Программы «Развитие научного потенциала высшей школы».

LPS-ИНДУЦИРОВАННАЯ ЭКСПРЕССИЯ C-FOS БЕЛКА В СТРУКТУРАХ ГИПОТАЛАМУСА ПРИ ЭЛЕКТРОБОЛЕВОМ РАЗДРАЖЕНИИ

Гаврилов Ю. В., Перекрест С.В., Новикова Н.С.

ГУ НИИ Экспериментальной медицины РАМН, Санкт-Петербург, Россия

Введение. При воздействии различных антигенов происходит не только формирование иммунного ответа, но и активация нейронов определенных структур мозга. С другой стороны, стрессорные воздействия не только изменяют активность нервной, сердечно-сосудистой и эндокринной систем, но и модулируют интенсивность иммунного ответа.

Цель. Для выяснения центральных механизмов реализации этих изменений проведен анализ степени активации нейронов гипоталамуса (по количеству c-Fos позитивных клеток) у крыс через 2 часа после внутривенного введения LPS (20 мкг/кг) и изучали те же эффекты после электроболевого раздражения.

Материал и методы. Исследование проведено на 52 крысах-самцах линии Wistar 200-250 г. Голени крыс раздражали постоянным током 2,5 мА длительностью 2 с через каждые 10 с в течение одного часа. Через 1 час после окончания раздражения внутривенно вводили LPS.

Результаты. Экспрессия c-Fos белка исследована в ряде структур гипоталамуса: переднем гипоталамическом ядре (AHN), паравентрикулярном ядре (PVH), дорзомедиальном гипоталамическом ядре (DMH), вентромедиальном ядре (VMH), латеральном гипоталамическом поле (LHA), заднем гипоталамическом поле (PH). Увеличение количества c-Fos позитивных клеток через два часа после введения LPS происходит в AHN, PVH и LHA,VMH, DMH, PH. После электроболевого раздражения число c-Fos позитивных клеток возрастает в AHN, PVH и LHA,VMH, DMH, PH. Сочетание электроболевого раздражения и введения LPS приводит к снижению числа c-Fos позитивных клеток в AHN, PVH, LHA, VMH по сравнению с их количеством у животных, которым вводили LPS без электроболевого раздражения.

Показано, что электроболевое раздражение приводит к подавлению антителообразования, индуцированного введением LPS (использован метод локального гемолиза с подсчетом количества антителообразующих клеток в селезенке крыс в %).

Заключение. Таким образом, снижение степени активации клеток гипоталамических структур (AHN, PVH, LHA, VMH) коррелирует с развитием стресс-индуцированной иммуносупрессии. Полученные данные позволяют охарактеризовать структуры мозга, участвующие в механизмах реализации изменений взаимодействия иммунной и нервной систем после электроболевого раздражения и оценить степень изменения их активации в этих условиях.

ИММУНОМОДУЛИРУЮЩИЕ ЭФФЕКТЫ ПРОФЕТАЛЯ В МОДЕЛИ ЛОКАЛЬНОГО ИММУННОГО ОТВЕТА К ЭРИТРОЦИТАМ БАРАНА ПРИ ПРОНИКАЮЩЕМ РАНЕНИИ ГЛАЗА КРЫС

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

Институт иммунологии и физиологии УрО РАН, Екатеринбург;
Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН, Пермь, Россия

Разработка методов направленной иммунокоррекции при проникающем ранении глаза и восстановление нарушенных функций иммунитета без развития нежелательных побочных эффектов является одной из важных проблем современной офтальмологии. Среди высокоэффективных отечественных иммуномодуляторов, не имеющих зарубежных аналогов, особое место занимает профеталь. Действующим веществом данного препарата является альфа-фетопротеин человека – сывороточный белок, основная функция которого - предупреждение иммунного конфликта при беременности. Данный белок относится к гликопротеинам с молекулярной массой 69 кD, состоит из одной полипептидной цепи, включающей ~600 аминокислот и 4% углеводов.

Цель работы: изучение иммуномодулирующего действия профеталя в модели локального иммунного ответа к эритроцитам барана при проникающем ранении глаза крыс.

Материалы и методы. Эксперимент выполнен на 51 крысе-самце популяции Wistar массой 238 ± 4 г. Животным 4-х групп под местной анестезией наносили проникающее ранение правого глаза. Были сформированы следующие экспериментальные группы животных: 1-я – проникающее ранение глаза (ПРГ) и введение 0,85% раствора NaCl; 2-я – ПРГ со стандартной терапией, включавшей глюкокортикоиды, антибиотики и нестероидные противовоспалительные препараты (ампициллин, гентамицин, диклофенак натрия, дексаметазон); 3-я – ПРГ со стандартной терапией и введением профеталя (0,1 мкг/кг), 4-я – ПРГ с введением профеталя. Все препараты вводили ежедневно подкожно в течение 13 суток. Контролем служили нетравмированные животные – 5-я группа. На 9-е сутки после нанесения травмы крыс сенсибилизировали эритроцитами барана (10^8 клеток в 0,1 мл 0,85% раствора NaCl подкожно в подошвенную поверхность правой стопы). На 13-е сутки вводили разрешающую дозу антигена (10^9 эритроцитов барана в 0,1 мл 0,85% раствора NaCl подкожно в подошвенную поверхность правой стопы, в левую контрольную стопу вводили 0,1 мл стерильного 0,85% раствора NaCl). Животных выводили из эксперимента на 14-е сутки методом декапитации под эфирным наркозом.

Оценивали: гуморальный ответ по числу антителообразующих клеток (АОК) в регионарных (правых подколенных), отдаленных (левых подколенных) лимфатических узлах (ЛУ), селезенке методом локального гемолиза в геле агарозы по Ерне; клеточноопосредованный ответ по развитию иммунного воспаления при реакции гиперчувствительности замедленного типа (ГЗТ), клеточность органов лимфомиелоидного комплекса. Статистический анализ проводили с использованием дисперсионного анализа и критерия Дункана для множественного сравнения между группами.

Основные результаты. У животных с ПРГ без введения препаратов выявлена достоверная стимуляция гуморального иммунного ответа в регионарном ЛУ в сравнении с нетравмированными крысами. Введение профеталя, как и препаратов стандартной терапии, угнетало образование антителопродуцентов (p<0,05 по отношению к 1-й и 5-й группам). При совместном введении профеталя и препаратов стандартной терапии суммирования депрессии антителообразования не выявлено, число АОК приближалось к уровню животных 4-й и 2-й групп (p<0,05 в сравнении с 1-й и 5-й группами). В отдаленном ЛУ число АОК приближалось к фоновому, т.е. регистрируемому у неиммунизированных животных. Статистически достоверных изменений количества АОК на фоне всех экспериментальных воздействий не выявлено. При введении профеталя и комбинации его с препаратами стандартной терапии число АОК в селезенке достоверно снижалось в сравнении с показателями крыс 1-й группы. У животных с ПРГ без введения препаратов выявлена стимуляция реакции ГЗТ. Введение профеталя приводило к достоверному угнетению выраженности иммунного воспаления. Сходный, но более выраженный эффект оказывала стандартная терапия. При комбинированном введении профеталя и препаратов стандартной терапии выявлена суммация эффекта угнетения реакции ГЗТ (p<0,05 по отношению ко всем остальным группам). При анализе изменения клеточности тимуса у животных, получавших профеталь, выявлено ее увеличение в сравнении с животными, получавшими стандартную терапию и нетравмированными крысами. Стандартная терапия вызывала снижение клеточности органа (p<0,05 по отношению к 1-й группе). При совместном введении профеталя и препаратов стандартной терапии клеточность тимуса приближалась к показателям 1-й группы. При введении препаратов стандартной терапии выявлено снижение клеточности костного мозга в сравнении с травмированными животными (1-я группа). Профеталь и комбинирование его с препаратами стандартной терапии приводили к увеличению численности клеточности в сравнении с другими группами (p<0,05 по отношению к 1-й, 2-й и 5-й группам).

Заключение. Профеталь супрессирует как гуморальный, так и клеточноопосредованный иммунный ответ. Полученные результаты указывают на перспективность дальнейших исследований иммуномодулирующих эффектов этого препарата при проникающем ранении глаза.

ОЦЕНКА ПАРАМЕТРОВ, ОПРЕДЕЛЯЮЩИХ СКОРОСТЬ ЗАКРЕПЛЕНИЯ МУТАНТОВ ВИЧ, НЕ РАСПОЗНАВАЕМЫХ ЦИТОТОКСИЧЕСКИМИ Т-ЛИМФОЦИТАМИ

Ганусов В.В., Р. Де Бур

Красноярский научный центр, Красноярск, Россия; Utrecht Univesity, Utrecht, The Netherlands

Известно, что в течение хронической болезни вирусом иммунодефицита человека, ВИЧ мутирует с большой скоростью, что позволяет ему избегать влияния как клеточного, так и гуморального иммунного ответов. Два основных параметра определяют вероятность закрепления мутантов ВИЧ, не распозноваемых $CD8^+$ Т-клеточным ответом: 1) относительное снижение приспособленности (или скорости репликации) мутантов по сравнению с исходным вариантом, 2) скорость отмирания клеток, инфицированных исходным вариантом ВИЧ и распознаваемых цитотоксическими Т лимфоцитами (ЦТЛ). В данной работе, применяя математические модели, мы разработали простые методы, позволяющие оценить эти два параметра,, используя данные *in vivo*.

ИММУНОЛОГИЧЕСКАЯ ПАМЯТЬ

Гариб Ф.Ю.

НМЦ по молекулярной медицине, НПЦ стоматологии Санкт-Петербургского государственного медицинского университета им. акад. И.П.Павлова, Россия

Глобальные инфекции создали реальную угрозу для сохранения человечества как вида. От СПИДа вымирает население целых государств. По-видимому, эволюция иммунной системы человека проиграет патогенным вирусам, которые неисчерпаемы в создании новых, все более опасных патогенов. Единственным путем защиты против них могут стать вакцины. Нужно учесть, что искусственного создания иммунной памяти (ИП) удалось достичь только против нескольких патогенов. Ускользая от иммунного надзора, почти все возбудители инфекций не оставляют достаточно стойкой ИП.

Описания невосприимчивости переболевших к повторной инфекции, т.е. по сути феномена ИП, стали отправным пунктом в иммунологии.

ИП проявляется в способности усиленно и качественно отвечать на патоген, который с успехом был элиминирован. ИП обеспечивают Т ($CD4^+$, $CD8^+$) и В-лимфоциты памяти, с помощью которых можно передать ее неиммунизированным реципиентам. ИП является важным проявлением адаптивного иммунитета и возникает благодаря многоэтапным процессам и гомеостатическим взаимодействиям с МНС, а возможно, и сохраненным для этого антигенам или их копиям.

Функционально активные хелперные Т-клетки памяти против антигена появляются быстро и достигают максимального уровня через 5 дней после индукции. Антиген-специфические В-клетки памяти появляются несколькими днями позднее, поскольку активация В-лимфоцитов происходит после взаимодействия с Th-клетками. Изменения в экспрессии поверхностных молекул в процессе перехода наивных Т- в Т-клетки памяти включают: возрастание числа молекул, которые контролируют адгезию-Т лимфоцитов с антигенпрезентирующими и эндотелиальными клетками; хемокиновых рецепторов, обеспечивающих их миграцию в зону воспаления (CCR5) и лимфатические узлы (CCR7); а также гранзима В и FasL, содействующих их выживанию и вовлечению в эффекторные функции. Изменяется чувствительность к антигенной стимуляции путем модуляции сигнала с TCR (CD45RO). Повышается эспрессия CD25 и CD69, характерных для эффекторных клеток и CD127 для рецепции IL-7, CD122 для IL-2 /IL-15. Возрастает экспрессия Bcl-2, который лимитирует продолжительность жизни клеток памяти.

ВЛИЯНИЕ β-ЭНДОРФИНА НА ПРОДУКЦИЮ ПРОВОСПАЛИТЕЛЬНЫХ ЦИТОКИНОВ МОНОЦИТАМИ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ

Гейн С.В., Горшкова К.Г.

Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН, Пермский государственный университет, Пермь, Россия

Опиоидный пептид β-эндорфин, принадлежащий к гипофизарным гормонам группы проопиомеланокортина, обладает широким спектром иммунорегуляторной активности. Поскольку ключевая роль в запуске иммунного ответа принадлежит клеткам моноцитарно-макрофагального ряда, целью работы явилось изучение влияния β-эндорфина на продукцию провоспалительных цитокинов моноцитами периферической крови. Объектом исследования служили моноциты периферической венозной крови здоровых мужчин-добровольцев в возрасте от 22 до 30 лет. Смешанную клеточную фракцию получали путём отстаивания гепаринизированной венозной крови в течение 2 ч при 37°С. Выделение фракции моноцитов производили методом адгезии на стеклянных чашках. Культивирование осуществляли в 24-луночных планшетах $1*10^6$ клеток в 1 мл RPMI 1640 во влажной атмосфере с 5% CO_2 при 37°С в течение 24 ч в присутствии ФГА 2,5 мкг/мл и ЛПС 0,1 мкг/мл. β-эндорфин вносили в культуры одновременно с ФГА и ЛПС в концентрациях 10^{-7}–10^{-11}М. Супернатанты хранили в замороженном состоянии при -20° С.

Установлено, что в нефракционированной клеточной культуре β-эндорфин (10^{-7}-10^{-11}М) активировал LPS-индуцированную продукцию IL-1β, не влияя на продукцию TNF-α и IL-6, одновременно угнетая синтез IL-8. Так же β-эндорфин в концентрации 10^{-11} М усиливал продукцию IL-1ra, рецепторного антагониста IL-1β. Лёгкий стимулирующий эффект пептид оказывал на спонтанную продукцию IL-1β в концентрации 10^{-7}-10^{-9}М. В присутствии ФГА на продукцию исследуемых цитокинов пептид влияния не оказывал. Все эффекты β-эндорфина проявлялись только в нефракционированных клеточных культурах, что указывает на необходимость кооперации различных клеточных популяций для реализации эффектов опиоидных пептидов. В очищенной фракции моноцитов влияния пептида на синтез IL-1β, TNF-α и IL-6 зарегистрировано не было. Таким образом, β-эндорфин оказывал иммуномодулирующий эффект в культуре клеток здоровых доноров, связанный со стимуляцией продукции IL-1β.

ИЗУЧЕНИЕ ОРГАН-СПЕЦИФИЧЕСКИХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК – НОВЫЕ ПОДХОДЫ И ПЕРСПЕКТИВЫ

Глейберман А.

Калифорнийский Университет, Сан-Диего, США

Стволовые клетки во взрослом организме ответственны за поддержание состава и сложной иерархической структуры клеточных популяций, а также за регенерацию тканей и органов. В то же время, многие аспекты биологии взрослых стволовых клеток и их связь с процессами развития и патологическими состояниями остаются слабо изученными. Основным препятствием в изучении взрослых стволовых клеток является отсутствие специфических маркеров, которые позволили бы их достоверно идентифицировать *in vivo* и *in vitro*. Мы смогли идентифицировать несколько типов орган-специфических взрослых стволовых клеток, используя трансгенный подход, основанный на экспрессии флуоресцентного репортера, управляемого регуляторными элементами гена промежуточных филаментов нестина. Результаты, полученные при изучении некоторых категорий стволовых клеток, в частности овальных клеток печени и стволовых клеток аденогипофиза, будут представлены в данном сообщении.

QUEST FOR ORGAN-SPECIFIC STEM CELLS: NEW APPROACHES AND PERSPECTIVES

Gleiberman Anatoli, Ph.D, D.Sci

Associate Project Scientist Department and School of Medicine Eucaryotic Regulatory Biology Program, University of California, San Diego, USA

Organ-specific adult stem cells are essential for cell renewal, tissue repair and maintenance of complex hierarchical structure of cell population. Still, many aspects of adult stem cell biology and their relation to the developmental and pathological processes remain poorly understood. One of the drawbacks in studying the role of adult stem cells is the lack of molecular markers which would allow them to be easily identified, isolated, and studied. Recently, we developed a transgenic approach based on the expression of fluorescent reporter driven by the regulatory elements of the nestin gene that permits direct visualization of several categories of adult stem cells in situ and their isolation and characterization *in vitro*. Results regarding such stem cells as liver oval cells and anterior pituitary stem cells will be discussed.

ИММУНОКОРРЕКТИРУЮЩЕЕ ДЕЙСТВИЕ НИЗКОИНТЕНСИВНЫХ НЕИОНИЗИРУЮЩИХ ИЗЛУЧЕНИЙ ПРИ ЭНДОТОКСИЧЕСКОМ ШОКЕ

Глушкова О.В., Новоселова Е.Г., Черенков Д.А., Новоселова Т.В., Хренов М.О., Лунин С.М., Парфенюк С.Б., Фесенко Е.Е.

Институт биофизики клетки РАН, Пущино Московской области, Россия

Введение. Одним из тяжелейших проявлений инфекционных воспалительных заболеваний является острый эндотоксический шок, при котором происходит гиперактивация иммунной системы. Известно, что основной задачей иммунокоррекции острых эндотоксических состояний является модуляция синтеза и секреции ключевых агентов этой патологии: провоспалительных цитокинов, оксида азота и белков теплового шока. Поэтому актуальным является поиск новых способов иммуномодуляции, способных устранить иммунопатологии, возникающие при развитии острого эндотоксического шока.

Целью настоящей работы явилось сравнительное исследование защитного действия курса ЭМИ СВЧ или НИЛИ на состояние иммунной системы мышей при остром эндотоксическом шоке

Материалы и методы. Во всех экспериментах использовали половозрелых мышей-самцов аутбредного стока NMRI, весом 20-25 г. Эндотоксический шок вызывали введением внутрибрюшинно ЛПС в количестве 250 мкг/100 г веса тела мыши. Низкоинтенсивное электромагнитное сантиметровое (ЭМИ СВЧ, 8-18 ГГц, 1 мкВт/см^2, 1 час в день в течение 10 дней) либо лазерное излучение (НИЛИ, 632,8 нм; 0,2 мВт/см^2, 1 мин) применяли

ВЛИЯНИЕ ЭМИ СВЧ И НИЛИ НА ПРОДУКЦИЮ ПРОВОСПАЛИТЕЛЬНЫХ ЦИТОКИНОВ, ОКСИДА АЗОТА И БТШ72 ПРИ ОСТРОМ ЭНДОТОКСИЧЕСКОМ ШОКЕ У МЫШЕЙ

	1	2	3	4
сыворотка крови				
TNF-α, пг/мл	46 ± 4,2	118 ± 10,5*	62,4 ± 6,2*•	68,2 ± 6,2*•
IL-2, пг/мл	169 ± 10,5	283 ± 20,1*	207 ± 20,1*	150 ± 12•
IL-6, пг/мл	10,5 ± 2	19,3 ± 1,1*	16,4 ± 1,8•	23,2 ± 2,2 •
IFN-γ, пг/мл	25,0 ± 1,8	26,8 ± 2,1	37,6 ± 2,2*•	44,5 ± 2,2*•
макрофаги				
TNF-α, пг/мл	9,3 ± 1,0	16,0 ± 1,2 *	12,5 ± 1,5	4,4 ± 0,8*•
IL-6, пг/мл	13,5 ± 2	24,5 ± 2,2 *	13,2 ± 1,9•	17,0 ± 2,1*•
NO, ммоль/мл	5,9 ±0,3	30,7 ±1,3**	24 ±1,1*	224 ±10,2*•
спленоциты				
IL-2, пг/мл	117 ±10	211 ± 15**	188 ± 14*	121 ± 9•
IL-6, пг/мл	33,6 ± 2,5	26,6 ± 2 *	25,8 ± 2,2*	14,5 ± 18*•
IFN-γ, пг/мл	10,7 ± 1,2	10,3 ± 1,05	7,2 ± 0,9*•	12,2 ± 1,2
БТШ72, усл.ед.	1,2 ± 0,2	3,0 ± 0,5*	5,8 ± 0,5*•	5,4 ± 0,6*•

Примечание: * - различия достоверны по сравнению с контролем ($p<0,05$), • - различия достоверны по сравнению с группой «острый стресс» ($p<0,05$).

за 12 часов до индукции острого эндотоксического шока. Определение концентрации TNF-α, IL-2, IL-6, IFN-γ проводили с помощью иммуноферментного анализа с использованием специфических антител (PeproTech, USA). Секрецию оксида азота измеряли по концентрации нитрита, являющегося конечным продуктом метаболизма короткоживущего соединения NO с использованием реактива Грисса. Экспрессию БТШ 72 определяли методом иммуноблотинга с использованием специфических антител (StressGen Biotechnologies), количественную оценку проводили с использованием программы Qapa. Достоверность различий экспериментальных данных оценивали, используя t-критерий Стьюдента.

Результаты. В нашей работе использовали 4 группы мышей: 1 – контроль; 2 – мыши, находящиеся в состоянии острого шока; 3 – НИЛИ + острый шок, 4 – ЭМИ СВЧ + острый шок. Результаты проведенного исследования представлены в таблице.

Показано, что применение как НИЛИ, так и ЭМИ СВЧ оказывает иммунопротекторное действие при эндотоксическом шоке, вызывая снижение продукции TNF-α и усиление экспрессии защитного белка БТШ 72. Кроме того, НИЛИ способно снизить степень гиперактивации иммунной системы, понижая концентрацию IL-6 в сыворотке крови и макрофагах и уменьшая продукцию IFN-γ спленоцитами облученных мышей по сравнению с необлученными животными, находящимися в состоянии эндотоксического шока. ЭМИ СВЧ снижало концентрацию IL-2 в сыворотке крови и продукцию IL-6 иммунными клетками, при этом синтез NO и IFN-γ был повышен.

Заключение. Таким образом, было обнаружено, что использование как ЭМИ СВЧ, так и НИЛИ в качестве профилактического средства способно повысить резистентность организма при развитии острого эндотоксического состояния. Работа поддержана Российским фондом фундаментальных исследований, проект № 04-04-48583 и Фондом Содействия Отечественной Науке.

ВЛИЯНИЕ ОЛИГОНУКЛЕОТИДОВ ДНК БАКТЕРИЙ РОДА *KLEBSIELLA*, СОДЕРЖАЩИХ CPG-МОТИВЫ, НА ФУНКЦИОНАЛЬНУЮ АКТИВНОСТЬ МОНОНУКЛЕАРНЫХ КЛЕТОК ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ И МОНОЦИТАРНЫХ ДЕНДРИТНЫХ КЛЕТОК

Гончаров А.Е., Титов Л.П., Янович О.О.

НИИ эпидемиологии и микробиологии, Минск, Республика Беларусь

Введение. Механизмы иммуномодулирующей способности ДНК бактерий на клетки системы иммунитета изучены недостаточно. Установлено, что иммунобиологический эффект ДНК обусловлен неметилированными CpG-последовательностями. Ранее нами показано влияние фрагментов ДНК *K. pneumoniae* на функциональную активность мононуклеаров (*Черношей Д.А., Титов Л.П.*, 2005). Это обусловило целесообразность исследования влияния синтетических CpG-мотивов бактерий рода *Klebsiella* на функцию моноцитарных ДК.

Цель и задачи. Целью работы был поиск перспективных CpG-мотивов генома бактерий рода *Klebsiella* с последующим их синтезом и изучением биологического эффекта на функциональную активность мононуклеаров периферической крови (МПК) и моноцитарных ДК для использования в качестве иммуномодуляторов или индукторов созревания ДК.

Материалы и методы. При анализе генома бактерий рода *Klebsiella*, взятого из базы данных NCBI, обнаружено два перспективных CpG-мотива: CpG1: 5'-gccggaaaacagcaaggcgctgcgccgtt и CpG2: 5'-cccgcagatgggcgccgcgccgga.

МПК здоровых доноров (n=14) инкубировали с олигонуклеоидами CpG1, CpG2, CpG1+2 в течение 24 часов. *Дендритные клетки*. Выделенные адгезией на пластике или иммуномагнитной сепарацией моноциты культивировали с ГМ-КСФ и IL-4 в течение 6 суток. Незрелые ДК (n=9) инкубировали с TNF-α, а также с CPG1+2 и TNF-α + CPG1+2 в течение 2 суток. *Фенотипирование клеток*

проводили при помощи цитометра "FACS Calibur" с использованием следующих антител: CD1a, CD11c, CD14, CD80, CD86, HLA-DR (Caltag). *Экспрессию мРНК цитокинов* определяли методом real-time PCR.

Основные результаты. Эффект отдельных олигонуклеотидов на экспрессию костимуляторных молекул и молекул ГКГ II класса на МПК был довольно слабым. Влияние комбинации обеих типов олигонуклеотидов проявилось достоверным (P<0,02) повышением процента экспрессии молекулы CD80 (но не CD86) как на лимфоцитах, так и на моноцитах (31,46±3,76, К – 16,64±3,71). Комбинация CpG-мотивов не оказывала достоверного влияния на экспрессию HLA-DR на МПК, однако при этом относительная интенсивность флюоресценции (ОИФ), характеризующая количество молекул на клетку, возрастала значительно (лимфоциты: К - 8,95±0,44, CpG1+2 – 31,59±5,21; моноциты: К - 18,03±2,87, CpG1+2 – 44,85±3,50) (P<0,01). При этом достоверного влияния комбинации олигонуклеотидов на экспрессию мРНК IL-4, IL-10 и IFN-γ выявлено не было (p>0,05). При культивировании ДК с олигонуклеотидами и TNF-α все препараты вызвали сравнимые изменения как в морфологии клеток, так и в их фенотипе, что проявилось увеличением экспрессии молекул CD1a, CD80 и HLA-DR при отсутствии влияния на CD86. Все три индуктора созревания экспрессировали сравнимые уровни мРНК IFN-α (IFN-α\β-актин: К – 0,579±0,161, TNF – 0,22±0,10, CpG1+2 – 0,17±0,05 и TNF+CpG1+2 – 0,18±0,12) и IL-10 (IL-10\β-актин: К – 0,032±0,0023, TNF – 0,0021±0,0015, CpG1+2 – 0,0018±0,0008 и TNF+CpG1+2 – 0,0009±0,0004). ДК, стимулированные только олигонуклеотидами, экспрессируют на порядок больше мРНК IL-12p40 (IL-12p40\β-актин: CpG1+2 –0,0124±0,00332) по сравнению с TNF-α – 0,0010±0,00012 (P<0,01).

Заключение. Показан иммунобиологический эффект CpG-последовательностей CpG1 и CpG2 генома *Kl. pneumoniae*. Установлено, что комбинация олигонуклеотидов CpG1 и CpG2 обладает более выраженной стимулирующей активностью. При ее воздействии повышалась экспрессия молекул CD80 и HLA-DR при отсутствии влияния на таковую CD86. Олигонуклеотиды действовали на незрелые ДК как индукторы созревания, что проявилось сравнимым с TNF-α усилением экспрессии молекул CD80, HLA-DR и CD1a. При этом отсутствие увеличения экспрессии молекулы CD86 в значительной степени компенсируется существенно большей экспрессией мРНК про-Тх1 цитокина IL-12, в сравнении со стандартным индуктором созревания – TNF-α. Не было выявлено различий в экспрессии молекул CD80, CD86 и HLA-DR МПК и ДК под действием CpG-мотивов, что указывает на схожесть механизмов активации всех АПК и наличие общих рецепторов к данным олигонуклеотидам, которые в результате могут быть использованы в качестве индукторов созревания ДК для их подготовки в клеточной иммунотерапии.

ВЛИЯНИЕ ХОРИОНИЧЕСКОГО ГОНАДОТРОПИНА НА ФОРМИРОВАНИЕ ВТОРИЧНОГО ИММУННОГО ОТВЕТА НА ФОНЕ РЕАКЦИИ ГИПЕРЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ ЗАМЕДЛЕННОГО ТИПА И ФАГОЦИТАРНУЮ АКТИВНОСТЬ ЛЕЙКОЦИТОВ

Горбунова О.Л., Ширшев С.В., Бахметьев Б.А.

Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН, Пермь, Россия

Наиболее важным гормоном с позиций сохранения и нормального развития беременности является хорионический гонадотропин (ХГ), активно контролирующий иммунные процессы. ХГ регулирует секрецию половых стероидов, изменяя при этом эндокринное зеркало, и определяет иммуносупрессию в период беременности. Взаимоотношение иммунной системы матери с фетоплацентарным комплексом включает в себя не только первичный, но и вторичный иммунный ответ, который играет наиболее важную роль в регуляции беременности. Показано, что системные материнские ответы при беременности относятся преимущественно к гуморальным, поскольку клеточноопосредованные иммунные реакции сопровождаются высокой продукцией провоспалительных цитокинов, которые могут оказывать цитотоксические эффекты на клетки фетоплацентарного комплекса, что, как правило, заканчивается резорбцией эмбриона. Однако Т-хелпер 1 ответы необходимы для противоинфекционной защиты. Поэтому ситуацию при беременности рассматривают как колеблющееся равновесие между двумя типами иммунных реакций, которое может смещаться в любом направлении. **Цель исследования** – оценить иммуномодулирующие эффекты ХГ как возможного регулятора вторичного гуморального иммунного ответа, на фоне первичной реакции гиперчувствительности замедленного типа (ГЗТ).

Материалы и методы. Опыты проведены на половозрелых мышах-самках породы Swiss массой 20-22 г. Мышам вводили ХГ подкожно через день в дозах 20 и 200 МЕ/мышь, соответствующих средним концентрациям гормона в сыворотке крови беременных женщин в различные сроки беременности. Для оценки вторичного гуморального ответа на фоне первичной реакции ГЗТ мышей иммунизировали внутрибрюшинно в дозе 10^8 эритроцитами барана (ЭБ), через 21 день животных реиммунизировали той же дозой ЭБ. ХГ инъецировали после повторной иммунизации в количестве 5 инъекций. Для проявления реакции ГЗТ спустя 4 суток мышам под апоневроз стопы вводили ЭБ $5 \cdot 10^7$ клеток. Через 24 часа одновременно оценивали выраженность реакции ГЗТ, определяли уровень антителообразующих клеток (АОК), продуцирующих иммуноглобулины G (IgG), непрямым методом локального гемолиза в геле агарозы по Ерне. Определяли титр специфических антител к ЭБ методом реакции прямой гемагглютинации и фагоцитарную активность лейкоцитов, оцениваемую по поглощению формалинизированных ЭБ. Рассчитывали поглотительную активность, количество фагоцитирующих фагоцитов, отдельно для моноцитов, нейтрофилов и перитонеальных макрофагов. Для контроля гонадотропного эффекта ХГ было проведено определение эстрадиола (E_2) и прогестерона (Pr) в сыворотке крови мышей иммуноферментным анализом.

Основные результаты. Введение ХГ дозозависимо повышало уровень IgG-АОК и титр специфических антител, не влияя на выраженность реакции ГЗТ. Таким образом, ХГ усиливал только вторичный гуморальный иммунный ответ, что, по-видимому, сопровождалось доминированием Т-хелпер 2 типа иммунного ответа над Т-хелпер 1. Оценка гонадотропного эффекта ХГ показала, что инъекции гормона статистически достоверно повышали уровень E_2 и Pr. Одновременно ХГ повышал уровень фагоцитирующих лейкоцитов крови, снижая процент и поглотительную активность перитонеальных макрофагов. По-видимому, ХГ-зависимая активация фагоцитоза лейкоцитов крови связана либо с эффектами высоких концентраций половых стероидов,индуцируемых гормоном, либо с повышением уровня специфических IgG-антител опсонизирующих антиген. Поскольку макрофаги в отличие от грану-

лоцитов более чувствительны к действию гормона и характеризуются более активным связыванием ХГ на поверхности клетки с гормон-специфическими структурами, угнетение фагоцитарной активности перитонеальных макрофагов, скорее всего, связано с непосредственным эффектом ХГ, что неоднократно было подтверждено нами в экспериментах *in vitro*.

Заключение. Таким образом, введение ХГ создает условия повышенной реактивности гуморальных иммунных реакций, и не влияет на клеточноопосредованные, которые могут оказывать негативные эффекты на процессы беременности. Стимуляция фагоцитарной активности лейкоцитов периферической крови ХГ на фоне адаптивных иммунных реакций, по-видимому, может служить одним из факторов, способствующих сохранению беременности, защищая плод от потенциальных бактериальных инфекций.

ПРОТЕКТИВНЫЕ СВОЙСТВА НЕКОТОРЫХ ПОВЕРХНОСТНЫХ РЕКОМБИНАНТНЫХ ПОЛИПЕПТИДОВ СТРЕПТОКОККОВ ГРУППЫ В

Грабовская К.Б., Леонтьева Г.Ф., Меринговa Л.Ф., Воробьева Е.И., Суворов А.Н., Тотолян Артем А.

ГУ НИИ экспериментальной медицины РАМН, Санкт-Петербург, Россия

Введение. Стрептококки группы В (СГВ) являются частой причиной ранней детской смертности, а также генерализованной инфекции в более поздний период новорожденности. В пожилом и старческом возрасте эти бактерии вызывают также тяжелые, нередко смертельные инфекции. В связи с этим в ряде лабораторий мира усиленно ведутся исследования по созданию вакцины против СГВ. Основное внимание при этом обращено на поверхностные белки стрептококка группы В (Bac, Sip, Scp, Bca).

Цель настоящего исследования - изучение иммуногенности и протективности двух поверхностных рекомбинантных полипептидов стрептококков группы В – P6 и Sca AB, а также комбинации этих полипептидов.

Материалы и методы. В работе использовали клинический изолят S.agalactiae 219/4849 серотипа Ibc (НИИЭМ РАМН). Полипептиды вводили подкожно самцам белых беспородных мышей весом 16-18 г (питомник Рапполово) дважды с интервалом в 30 дней, в первый раз в дозе 1,2 г/кг массы в смеси с полным адъювантом Фрейнда, во второй раз без адъюванта в дозе 0,6 г/кг массы. По достижении максимального уровня иммунного ответа (ИФА) мышам, получившим курс инъекций препаратов P6, Sca AB полипептидов или их смеси, вводили внутрибрюшинно сублетальную дозу суспензии штамма 219/4849 или дозу, равную LD50. Эффективность защиты оценивали по скорости элиминации возбудителя из организма мышей при введении сублетальной дозы и по снижению летальности при введении дозы, равной LD50. Оценку протективности антител к исследуемым полипептидам проводили также в опсонофагоцитарном тесте на монослое культивируемых перитонеальных макрофагов интактных мышей. При этом использовали как метод высева контактной смеси (макрофаг +стрептококк), так и прямое исследование монослоя макрофагов при взаимодействии с бактериями при микроскопии окрашенного монослоя на покровных стеклах.

Результаты. Установлено, что у мышей, иммунизированных полипептидом P6, очищение селезенки от бактерий начиналось через 2 часа после инфекции, и к 6 часам наступала полная элиминация возбудителя. Контрольные животные освобождались от стрептококка только к пятым суткам от начала эксперимента. Протективность антител к полипептиду P6 проявлялась и при более высоких дозах инфекта. Если в группе контрольных животных погибало до 50%, то у иммунизированных к пятым суткам наступало полное освобождение от стрептококка. Для проявления протективного эффекта P6 был необходим титр антител не менее 1/ 25000. Протективный эффект антител к полипептиду ScaAB проявлялся в значительно более низком титре – 1/1600. Очаг инфекции в селезенке при этом снижался до сотен и десятков бактерий. Защищенность мышей, иммунизированных смесью полипептидов P6 и ScaAB, была значительно выше, чем при иммунизации одним препаратом P6.

На монослое перитонеальных макрофагов было установлено, что на стадии адгезии преинкубированных с сыворотками микробов (30 минут контакта бактерий и монослоя) наиболее высокий индекс инфицирования (890) получен в системе с сывороткой к полипептиду P6, а в системе с анти-ScaAB он составил 530, причем процесс переваривания в последней был ускорен. Индекс инфицирования через 180 минут в контрольной системе (нормальная сыворотка) почти не изменился, в системе с антителами к P6 падал в 5 раз, тогда как в системе со ScaAB-антителами - в 23 раза. При оценке фагоцитоза бактериологическим методом для сравнения были использованы сыворотки анти-P6 и анти-(P6+ScaAB). Оказалось, что в пробах, содержащих сыворотку к полипептиду P6, где связывание бактерий с макрофагами идет наиболее активно, через три часа погибает более 80 процентов захваченных бактерий. Сыворотка, полученная к смеси белков, также значительно стимулирует захват и повышает перевариваю щую активность макрофагов.

Заключение. Показано, что поверхностные рекомбинантные полипептиды P6 и ScaAB обладают иммуногенностью и протективными свойствами, что позволяет рассматривать их в качестве компонентов рекомбинантной вакцины против стрептококков группы В.

ПРОДУКЦИЯ ЛИМФОЦИТ-АКТИВИРУЮЩИХ ФАКТОРОВ МАКРОФАГАМИ МЫШЕЙ ПРИ СТРЕССЕ И СТАРЕНИИ: МОДУЛИРУЮЩЕЕ ДЕЙСТВИЕ СИНТЕТИЧЕСКИХ ПЕПТИДНЫХ БИОРЕГУЛЯТОРОВ

Гумен А.В.[1], Рыбакина Е.Г.[2], Козинец И.А.[2], Шанин С.Н.[2], Малинин В.В.[1]

[1]Санкт-Петербургский институт биорегуляции и геронтологии СЗО РАМН;

[2]ГУ НИИ экспериментальной медицины РАМН, Санкт-Петербург, Россия

Старение организма в большой мере определяется снижением уровня активности защитных функций, проявляющемся в ослаблении реакции иммунной системы на различные дестабилизирующие воздействия, в том числе и стресс. Одним из информативных показателей, характеризующих функции иммунной системы, является изменение продукции мононуклеарными фагоцитами лимфоцит-активирующих факторов (LAF) – комплексного показателя, включающего ряд иммуномодулирующих цитокинов, в том числе интерлейкин-1 (IL-1), IL-6 и фактор некроза опухолей-α (TNF-α). Целью работы явилось изучение особенностей продукции LAF перитонеальными

макрофагами молодых и стареющих мышей при стрессе, а также возможности ее коррекции короткими синтетическими пептидами: вилоном (Lys-Glu), эпиталоном (Ala-Glu-Asp-Gly) и кортагеном (Ala-Glu-Asp-Pro). В работе использована модель ротационного стресса у мышей (CBAxC57BL6)F1. LAF-активность инкубатов макрофагов оценивали по их способности оказывать комитогенное действие на пролиферацию тимоцитов мышей, стимулированных субоптимальными дозами лектинов.

Установлено, что резидентные макрофаги стареющих, 19-20-месячных мышей, так же как и молодых, 2-месячных животных, не продуцируют ЛАФ без дополнительной стимуляции. Выделение ЛАФ макрофагами после их стимуляции липополисахаридом (LPS, Sigma) в условиях *in vitro* менее выражено у стареющих мышей, чем у молодых животных. Кратковременный ротационный стресс индуцировал продукцию LAF макрофагами молодых и, в меньшей степени, стареющих мышей. Стимуляция таких клеток LPS приводила к дополнительной продукции LAF макрофагами как молодых, так и стареющих мышей. При этом стимулированные LPS макрофаги молодых мышей, подвергнутых действию ротационного стресса, продуцировали LAF более интенсивно, чем стимулированные макрофаги стрессированных старых мышей. Впервые установлено, что пептидный биорегулятор вилон в дозах 0,0025- 0,25 нг/мл увеличивает спонтанную и стимулированную продукцию LAF макрофагами молодых и стареющих мышей через 2 ч после завершения стрессорного воздействия, а эпиталон в тех же дозах вызывает ее снижение. Действие кортагена на продукцию LAF макрофагами молодых и стареющих мышей различается: он преимущественно снижает реакцию на стресс макрофагов молодых животных и увеличивает ее у стареющих мышей. Результаты исследования позволяют заключить, что изменение продукции ЛАФ макрофагами, в том числе при стрессе, является одним из возможных механизмов нарушения функций иммунной системы при старении и открывают перспективу их коррекции короткими иммуномодулирующими пептидами. Работа поддержана грантом РФФИ № 03-04-49236.

МЕХАНИЗМЫ РЕГУЛЯЦИИ ХЕМОТАКСИСА ЛЕЙКОЦИТОВ КРОВИ ПРИ ВИРУСНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЯХ У ДЕТЕЙ

Гурина О. П., Блинов А. Е., Тимохина В. И., Варламова О. Н.

Санкт-Петербургская государственная педиатрическая медицинская академия, Санкт-Петербург, Россия

Регуляция процессов вовлечения и аккумуляции клеток системы мононуклеарных фагоцитов (СМФ), полиморфноядерных лейкоцитов (ПМЛ) и лимфоцитов в очаге воспаления осуществляется комплексом хемотаксических факторов (ХФ) – экзогенных и эндогенных. К последним относятся комплементзависимые (КЗХФ) и лимфокинопосредованные ХФ. Особенно важны КЗХФ С5а, С3а, благодаря своей силе и различным путям образования. При вирусном инфекционном процессе вовлечение системы комплемента происходит вторично, как следствие тканевого повреждения. Вирусное повреждение тканей *in vivo* способно стимулировать альтернативный путь активации комплемента и активировать таким образом функцию ХФ.

Работами ряда авторов было подтверждено присутствие в человеческой сыворотке ингибитора ХФ, который играет ведущую роль в сохранении нормального ответа на внедрение микроорганизмов и в защите хозяина от тканевого повреждения в иммунном воспалительном ответе. Показано наличие комплексной системы ингибиторов ХФ в человеческой сыворотке и плазме, направленной на комплементзависимые, бактериальные и лимфокинопосредованные хемотаксические факторы. Кроме ингибитора ХФ обнаружены клеточнонаправленные ингибиторы хемотаксиса, которые вырабатываются эффекторными клетками воспаления (нейтрофилы, моноциты) и лимфоцитами. Некоторые сывороточные белки могут прямо инактивировать хемотаксические факторы. С3а С5а инактивируются двумя сывороточными белками: анафилатоксин-инактиватором и инактиватором ХФ.

Цель работы - исследование механизмов регуляции клеточной подвижности в сыворотке крови 24 больных вирусной инфекцией в возрасте от 6 мес. до 10 лет с помощью анализа хемотаксической активности сыворотки, гуморальных факторов регуляции клеточной подвижности.

Методы исследования: в работе использованы чистые популяции полиморфноядерных лейкоцитов и мононуклеаров периферической крови крыс линии Вистар (тест-ПМЛ и тест-МН). Сыворотку больных в объеме 0,5 мл получали центрифугированием при 800g 10 мин, хранили при -20°С. Исследование хемотаксической активности гуморальных факторов регуляции хемотаксиса проведено в миллипоровых фильтрах с использованием индикаторных тест-клеток.

В острый период и при выписке детей из стационара в парных сыворотках исследовали хемотаксическую активность сыворотки для тест-ПМЛ и тест-МН, генерацию КЗХФ при активации компонентов комплемента по альтернативному пути (зимозаном), содержание клеточнонаправленного ингибитора хемотаксиса и инактиватора ХФ.

В качестве контроля использовали пулированную сыворотку здоровых детей, среду 199 с 5% эмбриональной телячьей сыворотки, инактивированной при 56°С в течение 45 мин, и хроматографически выделенный С5а компонент комплемента сыворотки крови человека.

Заболевание у детей протекало в тяжелой и среднетяжелой форме и сопровождалось развитием острого ларинготрахеобронхита, отеком гортани I-II степени, бронхообструктивным синдромом; у 11 из 24 больных вирусная инфекция осложнилась односторонней или двусторонней бронхопневмонией смешанной этиологии. Неблагоприятный преморбидный фон наблюдался у 88% больных: недоношенность, нефропатия беременных, частые вирусные заболевания, ангины, пневмонии, аллергодерматит, рахит.

Вирусологическое исследование показало, что этиологическим фактором у 7 детей явился грипп А-I, у троих – грипп А-2, у одного – грипп В, у двоих – микоплазма пневмонии, у 4 – РС-вирус, у одного – аденовирус, у одного – парагрипп, у 4 детей наблюдалась сочетанная вирус-вирусная инфекция. В анализах крови в острый период у 2 детей наблюдалась лейкопения, у 7 – ускоренная СОЭ.

Исследование, проведенное на тест-клетках, показало достоверное снижение хемотаксической активности сыворотки крови больных вирусной инфекцией в острый период заболевания как для ПМЛ ($p<0,001$), так и для МН ($p<0,05$), которая оставалась низкой в динамике болезни. Сыворотка больных вирусной инфекцией достоверно ниже генерирует КЗХФ для ПМЛ при дополнительной стимуляции компонентов комплемента зимозаном по сравнению с сывороткой крови здоровых детей.

В динамике болезни генерация КЗХФ для ПМЛ остается низкой, препятствуя аккумуляции клеток в воспалительный очаг. Для МН выработка хемотаксических факторов в сыворотке больных соответствует таковым у здоровых детей.

Добавление сыворотки крови детей с вирусной инфекцией к клеточным взвесям приводит к резкому ингибированию ($p<0,001$) хемотаксического ответа тест-клеток на С5а компонент комплемента. Уровень клеточно-направленных ингибиторов хемотаксиса при вирусной инфекции очень высок и снижается в динамике заболевания только для МН.

Известно, что инактиватор ХФ термолабилен. Нагревание сывортки при 56°С в течение 45 минут ведет к разрушению инактиватора ХФ и повышению хемотаксической активности сыворотки. В норме инактиватор ХФ в сыворотке крови отсутствует.

У больных вирусной инфекцией инактивация при 56°С приводит к усилению хемотаксической активности сыворотки для тест-клеток, однако это усиление не достоверно. Инактиватор ХФ отчетливо выявляется у 14 из 24 больных.

Таким образом, снижение хемотаксической активности сыворотки при вирусной инфекции у детей определяется не только нарушением генерации КЗХФ, но появлением уже в острый период заболевания инактиватора ХФ, препятствующего проявлению активности имеющихся в сыворотке хемотаксических стимулов.

Обнаружена тесная связь между уровнем эндогенного ингибитора ХФ и хемотаксической активностью обработанной зимозаном сыворотки или плазмы. Высокий уровень ингибитора ХФ коррелирует с низкой аккумуляцией клеток в очаге при остром и хроническом воспалении. Изучение факторов, контролирующих хемотаксис, может привести к определению путей увеличения и уменьшения ответа, что в конечном итоге важно для контроля за воспалением.

Выводы:

1. Хемотаксическая активность сыворотки крови больных вирусной инфекцией снижена, что может быть обусловлено снижением ключевого компонента комплемента С3 в сыворотке крови и низкой генерацией комплемент-зависимых хемотаксических факторов при активации компонентов комплемента по альтернативному пути.

2. Процессы аккумуляции клеток в очаге воспаления регулируются ингибиторами и инактиватором ХФ, появляющимися в сыворотке крови больных вирусной инфекцией в острый период заболевания.

ВЛИЯНИЕ СИСТЕМЫ ФАГОЦИТИРУЮЩИХ МОНОНУКЛЕАРОВ НА ЭРИТРОПОЭЗ В ЭРИТРОБЛАСТИЧЕСКИХ ОСТРОВКАХ КОСТНОГО МОЗГА

Данилова И.Г., Юшков Б.Г., Улитко М.В., Чиши М.А.

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

Введение. Известно, что процессы созревания эритроидных клеток протекают в костном мозге в специфических образованиях, названных эритробластическими островками (ЭО). Являясь центральной клеткой эритробластического островка, макрофаги обладают высоким аффинитетом по отношению к эритроидным клеткам, участвуют в рофеоцитозе и передаче эритропоэтинактивных соединений, а также создают специфическое гемопоэтическое микроокружение, поддерживающее эритропоэз.

Целью работы явилось изучить роль системы фагоцитирующих мононуклеаров (СФМ) и влияние ее функционального состояния на эритропоэз в эритробластических островках костного мозга.

Основные задачи: 1. Выяснить характер воздействия СФМ на процессы созревания эритроидных клеток в ЭО костного мозга интактных крыс.

2.Изучить влияние спленэктомии на эритропоэз в ЭО костного мозга

Материалы и методы. Опыты проводились на беспородных крысах-самцах массой 180-230 г. Функциональное состояние макрофагов изменяли путем однократного введения активатора макрофагов отечественного препарата тамерит и их ингибитора, производного полигалактозы – каррагенана. Оба вещества вводились однократно в дозе 2 мг/кг и 10 мг/кг соответственно. Изменение количества клеток СФМ достигали удалением селезенки. Абсолютное содержание и распределение ЭО по классам зрелости в костном мозге определяли по методу Ю.М.Захарова. Исследования проводились через 4 и 17 часов после модуляции функционального состояния макрофагов.

Результаты. У интактных животных в костном мозге активация макрофагального звена в ранний срок исследования не оказывает влияния на абсолютное количество ЭО, однако увеличивается количество вновь образующихся островков 1,2 класса зрелости, а через 17 часов после стимуляции вызывает замедление островкового эритропоэза. Ингибирование макрофагов приводит к резкому снижению образования ЭО.

При удалении селезенки уменьшается суммарное количество клеток СФМ в организме, что отражается на состоянии островкового эритропоэза. Через 4 часа после спленэктомии происходит активация эритропоэза в эритробластических островках, связанная с образованием островков *de novo*. Через 17 часов после операции количество ЭО снижается. Как стимуляция макрофагов, так и их ингибиция у спленэктомированных животных уменьшают количество ЭО через 17 часов после удаления селезенки.

Таким образом, полученные данные свидетельствуют о том, что поддержание стабильного эритропоэза зависит не только от продукции макрофагами регуляторов эритропоэза, но и от общего количества клеток, образующих систему фагоцитирующих мононуклеаров.

НЕЙТРОФИЛЫ РЕГУЛИРУЮТ ФОРМИРОВАНИЕ МИКРОБИОЦЕНОЗА СЛИЗИСТЫХ ОБОЛОЧЕК

Долгушин И.И., Андреева Ю.С., Мезенцева Е.А., Савочкина А.Ю., Плеханова Е.В., Свиридов М.А., Пешикова М.В.

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

В последние годы показано, что значительная часть нейтрофилов покидает ткани и мигрирует на поверхность слизистых оболочек, где они и разрушаются, в результате чего выделяются наружу антимикробные продукты лизосом, которые, обладая бактерицидностью, влияют на микрофлору, заселяющую слизистые оболочки. В этой связи возникло предположение, что одной из функций цервикальных и вагинальных нейтрофилов является участие в регуляции микробиоценоза этих биотопов. Данное

предположение и определило цель исследования - изучить роль нейтрофилов и их секреторных продуктов в регуляции микробиоценоза влагалища здоровых женщин и женщин с бактериальным вагинозом. Задачи исследования: оценить функциональную активность нейтрофилов периферической крови после активации различными видами микроорганизмов и латексом *in vitro*; изучить влияние нейтрофилов, их секреторных продуктов, лейкоцитарной взвеси и гепаринизированной крови на микрофлору влагалищной слизи здоровых женщин; исследовать влияние нейтрофилов, их секреторных продуктов, лейкоцитарной взвеси и гепаринизированной крови на микрофлору влагалищной слизи женщин с бактериальным вагинозом. Функциональный ответ нейтрофилов крови оценивался по лизосомальной активности; с помощью спонтанного и индуцированного НСТ-теста проводилось определение внутриклеточного кислородзависимого метаболизма; исследование фагоцитарной активности нейтрофилов проводилось на модели поглощения частиц полистирольного латекса и контрольных штаммов микроорганизмов (*S. aureus* (штамм 209), *E. coli* (штамм М-17), *Lactobacillus spp., Bifidobacterium spp.* Секреторные продукты нейтрофилов получали методом, разработанным научным коллективом, возглавляемым профессором Долгушиным И.И. Для определения бактерицидной активности гепаринизированной крови, лейкоцитарной взвеси, нейтрофилов и их секреторных продуктов использовали **у**прощенный фотонефелометрический метод. В результате проведенных исследований установили, что нейтрофилы способны фагоцитировать частицы латекса, условно-патогенные и непатогенные микроорганизмы, при этом поглотительная функция нейтрофилов была минимальной по отношению к бифидобактериям. Процент клеток, восстанавливающих НСТ после активации микроорганизмами и латексом, был выше исходного уровня. Лизосомальная активность не изменялась при действии частиц полистирольного латекса, лакто- и бифидобактерий в сравнении с исходным уровнем свечения лизосом и была выше после взаимодействия нейтрофилов с *E. coli, S. aureus***.** У здоровых женщин содержание лактобактерий в пробе под действием нейтрофилов, их секреторных продуктов, гепаринизированной крови и лейкоцитарной взвеси существенно не менялось. Нейтрофилы значимо снижали лишь содержание коагулазонегативных стафилококков в вагинальной слизи. На дрожжеподобные грибы и *E.coli* все тестируемые образцы оказывали бактерицидное действие, однако значимых отличий по сравнению с контролем выявлено не было. У женщин с бактериальным вагинозом было отмечено снижение содержания в секрете количества стафилококков под действием секреторных продуктов нейтрофилов, лейкоцитарной взвеси и гепаринизированной крови. Инкубация с вагинальным секретом очищенной фракции нейтрофилов не оказывала значимого влияния на содержание стафилококков. Нейтрофилы (НФ), супернатант неактивированных (СНН) и активированных (САН) нейтрофилов, лейкоцитарная взвесь (ЛВ) и гепаринизированная кровь значимо снижали содержание гарднерелл в вагинальной слизи. При изучении влияния продуктов нейтрофилов на лактофлору было обнаружено незначительное бактерицидное действие супернатантов на эти бактерии. Вместе с тем было установлено, что добавление цельной крови к вагинальному содержимому женщин с бактериальным вагинозом стимулирует рост лактобактерий. В результате проведенных исследований можно сделать вывод о том, что нейтрофилы и их секреторные продукты оказывают регулирующее и нормализующее влияние на состав флоры слизистых оболочек, тем самым участвуя в селективной деконтаминации влагалищного биотопа. Бактериальный вагиноз – это эпителиальная инфекция, и, по-видимому, дефицит локальной лейкоцитарной реакции может быть одной из причин развития вагинального дисбиоза. В то же время восполнение этих клеток в секрете нормализует влагалищную флору.

ЦИТОТОКСИЧЕСКИЕ РЕАКЦИИ ВРОЖДЁННОГО ИММУНИТЕТА: ЭВОЛЮЦИОННЫЙ АНАЛИЗ

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

НИИ экспериментальной медицины РАМН, Санкт-Петербург, Россия

Несмотря на более низкую организацию и простое строение, у иглокожих выявлены механизмы, эквивалентные клеточным реакциям позвоночных. Однако молекулярные компоненты системы врождённого иммунитета, по всей видимости, не являются гомологами молекулярных структур, участвующих в реализации приобретённого иммунитета. Изучение способности клеток иглокожих отвечать специфическим синтезом инактивирующих веществ, или молекул, обладающих пролиферативным действием, является важным в понимании эволюции иммунных реакций и механизмов клеточного распознавания, промежуточных между реакциями позвоночных и беспозвоночных.

Цели исследований заключались в выявлении основных форм защитных реакций низших вторичноротых животных (на примере иглокожих), исследовании их клеточных и гуморальных механизмов, а также поиске примитивных форм реакций приобретенного иммунитета. Поставленными задачами были отработка метода оценки цитотоксичности и эффективности клеточных защитных реакций иглокожих, показать наличие медиаторных сигналов в реализации врождённого иммунитета. Изучение механизмов повышения числа клеток в циркуляции и поиск их медиаторов проводились в эксперименте индукции цитотоксичности путем переноса целомической жидкости предактивированного животного интактному. В качестве активирующего агента применяли суспензию зимозана, обьёмная доля, концентрация и срок стимуляции которого были специально подобраны. Модифицированные зимозаном свойства целомической жидкости обусловлены исключительно клеточным звеном врождённого иммунитета. Проведена адаптация классического метода цитотоксической реакции клеток целомической жидкости с оценкой возможности аллогенной реакции с целомоцитами A. rubens в условиях *in vitro*. Также была проведена оценка локального гемолиза нефиксированного слоя ЭЧ при длительной инкубации с целомоцитами, выделенными из ЦЖ предактивированного липополисахаридом животного.

Показано, что эффект прямой цитотоксичности в виде выраженного гемолиза ЭЧ опосредован гемолитическими факторами, синтезированными агрегатами клеток, образовавшихся в ходе межклеточной кооперации. Впервые нами был освоен и успешно применен новый метод по фракционированию клеток морской звезды. Благодаря новому методу фракционирования пула циркулирующих клеток путем центрифугирования в градиенте плотности диатризоата натрия подтверждено суще-

ствование трёх главных субпопуляций целомоцитов – лимфоцитоподобных клеток, агранулярных и гранулярных амёбоцитов. Установлено, что фракции целомоцитов различаются по цитотоксической активности, которая минимальна во фракции лимфоцитоподобных клеток и максимальна во фракции гранулярных целомоцитов. При этом цитотоксический эффект, как правило, связан с формированием кластеров целомоцитов в центре зон гемолиза. Число зон гемолиза коррелирует с уровнем выхода гемоглобина из эритроцитов в надосадочную жидкость. Одновременно целомическая жидкость интактных A.rubens не обладает цитотоксичностью для эритроцитов человека. Цитотоксичность целомоцитов нарастает под влиянием рекомбинантных IL-1α, C3a и IFNγ человека. Исследования проведены *in vitro* в адаптированной модификации классического цитотоксического теста. Аллогенная культура состояла из циркулирующих в ЦЖ клеток, обработанных митомицином С (клетки-мишени) и интактных клеток другой звезды (клетки-эффекторы). Цитотоксическую активность клеток-эффекторов оценивали по их способности восстанавливать краситель в МТТ-тесте на сроках 24 и 96 ч, а также по накоплению NO в культуральных надосадках. Выявлено, что целомоциты A.rubens способны к аллогенному распознаванию, на что указывает повышенный уровень NO в надосадках через 24 ч и прирост показателей МТТ-теста на сроках 24 и 96 часов инкубации после смешивания клеток мишеней и эффекторов.

Главная роль в осуществлении цитотоксических реакций принадлежит целомоцитам, которые, по-видимому, способны также к аллогенному распознаванию. Изучение реакций врождённого иммунитета иглокожих даёт основания предполагать наличие системы медиаторных сигналов, определяющих стадийность защитных и репаративных процессов. Работа поддержана грантами РФФИ № 04-04-49069 и 04-04-49342.

МОЛЕКУЛЯРНЫЕ И КЛЕТОЧНЫЕ МЕХАНИЗМЫ ДЕЙСТВИЯ ИММУНОМОДУЛЯТОРОВ МИКРОБНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ НА ФУНКЦИОНАЛЬНУЮ АКТИВНОСТЬ ДЕНДРИТНЫХ КЛЕТОК

Егорова Н.Б.[1], Ахматова Н.К.[1], Семенова И.Б.[2], Киселевский М.В.[3], Курбатова Е.А.[1], Грубер И.М.[1]

[1]ГУ НИИВС им И.И. Мечникова РАМН, Москва;

[2]ГУ Научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им.Н.Ф.Гамалеи, Москва;

[3]Российский онкологический научный центр им. Н.Н. Блохина РАМН, Москва

Открытие молекулярно-клеточных механизмов действия эффекторов системы врожденного иммунитета делает возможным проведение исследований, которые позволили бы характеризовать механизм действия различных иммуномодуляторов на уровне таких функций врожденного иммунитета как распознавание патогена, активация клеток, осуществляющих процессинг и презентацию антигена, экспрессия цитокинов, инструктивная роль этих факторов в программировании направления эффекторной дифференцировки иммунных лимфоцитов. Ключевая роль в осуществлении этих функций принадлежит дендритным клеткам (ДК), которые и явились предметом настоящего исследования.

Целью исследования являлось изучение механизма действия иммуномодуляторов микробного происхождения на функциональную активность ДК.

Материалы и методы. Предметом исследования были 3 иммуномодулятора микробного происхождения, разрешенные в практике здравоохранения: поликомпонентная вакцина «Иммуновак ВП-4» из антигенных компонентов 4-х условно-патогенных микроорганизмов, ликопид и анатоксин стафилококковый очищенный (АСО). Дендритные клетки получали из костного мозга, из клеток эмбриональной печени мышей и из мононуклеаров периферической крови доноров [Чкадуа Г.З и др., 2002]. В качестве индукторов созревания ДК были исследованы указанные иммуномодуляторы в сравнении с референс-препаратом TNF-α. Зрелость ДК оценивали по иммунофенотипу при помощи проточного цитометра FacsCalibur («Becton Dickinson», США) с применением соответствующих моноклональных антител. Функциональную активность ДК оценивали по продукции ими цитокинов (метод твердофазного иммуноферментного анализа с использованием тест-систем фирмы “Biosource” (Бельгия) и по антигенпрезентирующей способности (АПС) ДК.

Результаты. Созревание ДК в организме происходит под действием патогена, в экспериментальных исследованиях в качестве индуктора созревания ДК используют TNF-α [Lotze M.,1999]. В наших экспериментах была изучена способность 3-х иммуномодуляторов микробного происхождения к индукции созревания ДК. Добавление в среду культивирования ДК иммуномодуляторов способствовало экспрессии маркеров зрелости CD38, CD40, CD80, CD86, CD83, MHC I и II. В таблице представлен процент клеток, содержащих наиболее важные костимулирующие молекулы и молекулы антигенного представления. Иммуновак ВП-4 и ГМДП индуцировали экспрессию важнейших маркеров зрелости ДК в такой же степени, как TNF-α. АСО вызывал экспрессию ряда маркеров (CD80, CD86, MHC I), однако не было увеличения важнейших показателей зрелости – маркера терминальной дифференцировки ДК – CD83 и MHC II.

Созревшие ДК являются продуцентами широкого спектра провоспалительных и регуляторных цитокинов, среди которых наиболее важным является IL-12, играющий важнейшую роль в программировании дифференцировки CD4-Т лимфоцитов по Th1-типу (таблица).

Антигенпрезентирующая функция ДК изучена *in vitro* на модели презентации опухолевых антигенов лимфоцитам и определения их цитотоксичности по отношению к клеточным линиям этих опухолей (таблица). Видно, что цитотоксичность лимфоцитов в смеси со зрелыми ДК колеблется в пределах (36,6-30,8)%, что мало отличается от активности незрелых ДК (23,6-27,0)%. Цитотоксичность увеличивалась только при действии смеси лимфоцитов с ДК, предварительно нагруженных гомологичным опухолевым антигеном. Так, при обработке ДК антигеном опухолевой линии К562 цитотоксичность в отношении этой же линии клеток была в пределах (62,6-44,2)%. А в отношении клеток опухоли Эрлиха она составляла (32,8-34,6)%,

ВЛИЯНИЕ ИММУНОМОДУЛЯТОРОВ МИКРОБНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ НА ФУНКЦИОНАЛЬНУЮ АКТИВНОСТЬ ДЕНДРИТНЫХ КЛЕТОК

Исследуемые параметры	Объект исследования	Показатели	Незрелые ДК	Индукторы созревания ДК			
				ВП-4	ГМДП	АСО	TNF-α
Индукция созревания, % клеток	ДК из селезенки мыши	CD80	8,1	67,3	58,6	78,5	65,9
		CD86	5,3	64,8	47,5	37,3	61,2
		MHCI	9,3	6,7	2,5	25,4	31,0
		MHCII	9,1	26,7	18,9	0,5	32,3
	ДК из крови доноров	CD80	12,3	84,3	22,1	32,0	25,9
		CD83	0	55,8	53,7	1,5	62,3
		HLA-DR	16,6	65,6	46,3	34,6	50,5
Экспрессия цитокинов, пкг/мл	В культуре ДК мышей	IL-1β	0	195	208	53,2	26,7
		IL-2	13,6	15,7	17,2	12,8	13,6
		IL-4	90	602	538	315	566,2
		IL-6	101,5	92	103	82	109,6
		IL-12	5	283	251	106,2	152,1
		TNF-α	77,3	711,3	613	411	733,3
		IFN-γ	18,4	145	12,3	112,3	159
Презентация антигенов опухолевых линий клеток опухоли Эрлиха и К-562 Т лимфоцитам, % лизированных клеток	Л[1)]	К562[3)]	23,6	-	-	-	Н.о.
	Л	Эрлих	27,0	-	-	-	Н.о.
	Л+ДК	К562	25,7	32,4	33,8	30,8	Н.о.
	-«-	Эрлих	28,4	36,4	36,6	31,2	Н.о.
	Л+ДК+ОАГ[2)] К562	К562	27,2	62,6	57,2	44,2	
		Эрлих	34,6	34,8	34,6	32,8	Н.о.
	Л+ДК+ОАГ[2)] Эрлих	К562	30,4	34,8	34,6	32,8	Н.о.
		Эрлих	30,4	65,2	67,2	41,8	Н.о.

Примечание: [1)] Лимфоциты; [2)] опухолевые антигены, которыми нагружали ДК; [3)] опухолевые линии клеток, в отношении которых определяли цитотоксичность.

т.е. в тех же пределах, в каких вызывали лизис ДК, не нагруженные опухолевым антигеном.

Заключение. Проведенные исследования показали, что исследованные иммуномодуляторы Иммуновак ВП-4, ГМДП, АСО являются индукторами созревания ДК, которые при этом приобретают фенотип, свойственный зрелым ДК, способность к синтезу широкого спектра цитокинов, в том числе IL-12, играющего важную роль в выборе направления дифференцировки Т лимфоцитов по Th1-типу. Антигенпрезентирующая активность ДК показана по цитотоксичности в отношении клеток перевиваемых опухолевых линий.

ОСОБЕННОСТИ НЕЙРОИММУНОРЕГУЛЯЦИИ В ОТДАЛЕННОМ ПЕРИОДЕ ТЯЖЕЛОЙ СОЧЕТАННОЙ ЧЕРЕПНО-МОЗГОВОЙ ТРАВМЫ

Емельянов Ю.В.

Омская государственная медицинская академия, Омск, Россия

Введение. Известно, что более чем у половины пострадавших через год после перенесенной черепно-мозговой травмы диагностируется посттравматический синдром, где доминирующими являются синдром вегетативной дисфункции, посттравматическая церебрастения (Осипова и др., 2005). Однако роль перестройки функционирования системы регуляторной интеграции, в составе которой тесно взаимодействуют структурно-функциональные звенья и клеточные элементы нервной и иммунной систем, в развитии посттравматического синдрома неясна.

Целью данной работы явилось изучение изменения интегративной деятельности высших отделов нервной системы, а также качества нервной регуляции функций иммунной системы в отдаленном периоде тяжелой сочетанной черепно-мозговой травмы (ТСЧМТ).

Материалы и методы. Исследование проведено на 32 белых беспородных крысах-самцах массой 200-250 г, перенесших ТСЧМТ по Ноблу-Коллипу под нембуталовым наркозом. Контрольную группу составили 20 интактных животных, получавших наркоз. Обследования проводились на 30 сутки посттравматического периода. Ориентировочно-исследовательское поведение и эмоционально-психические реакции крыс изучали в тесте открытого поля (Буреш и др., 1991), болевую чувствительность - в тестах отдергивания хвоста и горячей пластины (Назаренко и др., 1996). Оценку силы иммунного ответа проводили путем определения количества антителообразующих клеток (АОК) по Cunningham. При статистической обработке использовали среднюю арифметическую с её ошибкой, для сравнения двух попарно не связанных выборок по их средним тенденциям - *t*-критерий Стъюдента.

Основные результаты. Как показали наши исследования, на 30 сутки посттравматического периода поведенческая деятельность крыс характеризовалась нарушением ее составляющих. Длительность латентного периода превышала показатели контроля ($p<0,05$). Крысы, перенесшие ТСЧМТ, затратили в 1,5 раза больше времени для того, чтобы покинуть ярко освещенную центральную площадку, проявляя нерешительность и страх при пересечении черты, отделявшей площадку от остального поля. Горизонтальная активность у животных была снижена. Доминирующим актом поведения у крыс являлись реакции чистки (груминг), выраженность которых в сочетании с параметрами вегетативного компонента эмоций – числом уринаций и дефекаций, согласно Орловой с соавт. (2003), составляет фактор «тревожности» в поведении животных. Интенсивность и продолжительность груминговых движений превышала

контрольные значения в 3,5 раза ($p<0,01$). При этом было снижено число уринаций ($p<0,01$). Посттравматические нарушения ЦНС регистрировались и при исследовании болевой чувствительности. Так, время реакции на болевое раздражение в тесте отдергивания хвоста на 30-е сутки после травмы было уменьшено в 3 раза ($p<0,05$), при этом в тесте горячей пластины у травмированных и интактных животных оно не различалось. Обнаружение усиления чувствительности только в одном из болевых тестов позволяет заключить, что у животных, перенесших ТСЧМТ, нарушена субъективная оценка значимости болевого стимула на уровне высших отделов головного мозга. При этом наблюдалось угнетение иммунного ответа: количество АОК на 30 сутки посттравматического периода составляло 46,6% от уровня контроля ($p<0,01$). Взаимозависимость показателей центральной нервной и иммунной системы подтверждалась наличием корреляционных связей между горизонтальной активностью животных и количеством АОК ($r>0,68$, $p<0,05$), вертикальной активностью - АОК ($r>0,62$, $p<0,05$), неподвижностью крыс - АОК ($r>0,58$, $p<0,05$), числом дефекаций – АОК ($r>0,61$, $p<0,05$).

Заключение. Таким образом, в отдаленном периоде ТСЧМТ имеют место выраженные, взаимосвязанные нарушения центральной нервной и иммунной систем. Повреждения центральных звеньев функциональной системы иммунного гомеостаза обусловливают неспособность развития должного иммунного ответа - формирование вторичного иммунодефицита. Дизрегуляция в системе иммунитета поддерживает нарушения ЦНС, внося свой вклад в развитие посттравматического синдрома. Наличие дизрегуляционной патологии интегративных систем во многом определяет прогредиентное течение посттравматического периода и позволяет определить лечебную тактику, включающую воздействия на нервную и иммунную системы.

ЦИТОКИНОВЫЕ МЕХАНИЗМЫ ГЛУТАМАТЕРГИЧЕСКОЙ МОДУЛЯЦИИ РАЗВИТИЯ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО АЛЛЕРГИЧЕСКОГО ЭНЦЕФАЛОМИЕЛИТА

Житнухин Ю.Л., Абдурасулова И.Н., Гмиро В.Е., Клименко В.М.

НИИ экспериментальной медицины РАМН, Санкт-Петербург, Россия

В развитии аутоиммунных заболеваний ЦНС наряду с провоспалительными цитокинами (ЦК) играет роль повышенная активность глутаматергической системы. Экзайтотоксичность глутамата опосредуется NMDA и AMDA-рецепторами. Как было показано, блокада NMDA-рецепторов существенно снижает уровни TNF-α в крови и мозге. Напротив, активация NMDA-рецепторов приводит к высвобождению провоспалительных ЦК, которые участвуют в регуляции иммунных функций и вовлечены в патогенез рассеянного склероза (РС) и экспериментального аллергического энцефаломиелита (ЭАЭ). ЭАЭ - воспалительное демиелинизирующее заболевание ЦНС, модулирующее в эксперименте РС.

Цель работы – изучение влияния блокады NMDA-рецепторов глутамата на развитие ЭАЭ, а также способности глутамата модулировать активность цитокинов в ЦНС и селезенке животных с ЭАЭ. ЭАЭ вызывали однократной инокуляцией гомогената гомологичного спинного мозга в полном адъюванте Фрейнда крысам Wistar t весом 170-190 г. Степень тяжести и распространенности неврологических симптомов (парезы, параличи) оценивали посредством клинического индекса в баллах от 0 (отсутствие клинических проявлений) до 6 (летальный исход). Амантадин (А), обладающий свойствами антагониста NMDA-рецепторов, вводили ежедневно в/брюшинно в дозе 20 мг/кг массы тела в период с 1 по 14 дни после иммунизации (д.п.и.). Исследовали паттерн экспрессируемых в мозге и селезенке ЦК и его зависимость от выраженности неврологических нарушений при ЭАЭ. Экспрессию мРНК ЦК (TNF-α, IL-1β, IL-lra и IL-I0) анализировали на 7-й (индуктивная фаза), 14-й (клинический период) и 30 (период выздоровления) д.п.и. методом обратной транскрипции с последующей полимеразной цепной реакцией (ОТ-ПЦР). Введение А привело к снижению заболеваемости, удлинению латентного периода, снижению тяжести ЭАЭ, отсутствию летальных исходов и укорочению продолжительности клинически выраженного заболевания. Были обнаружены различия в экспрессии ЦК в спинном мозге (СМ) и селезенке. В то время как экспрессия мРНК ЦК в селезенке наблюдалась у всех животных после инокуляции энцефалитона, в СМ она наблюдалась только у больных крыс, при этом экспрессия провоспалительных ЦК в ЦНС коррелировала с выраженностью и длительностью клинических проявлений: у животных с легким течением ЭАЭ экспрессия мРНК TNF-α и/или IL-1β выявлялась только на пике заболевания, тогда как у тяжело болевших крыс сохранялась в более поздний период (30 д.п.и.). Экспрессия мРНК IL-1ra и IL-I0 наблюдалась в фазе выздоровления; у животных с экспрессией мРНК IL-I0 отсутствовала экспрессия мРНК TNF-α, а у животных с экспрессией мРНК IL-1ra не наблюдалась экспрессия мРНК IL-1β. Не отмечено подавления экспрессии мРНК провоспалительных ЦК в СМ крыс, заболевших, несмотря на введение А: при легком течении ЭАЭ отмечалась экспрессия одного из них, при выраженной симптоматике – обоих. Кроме того, в СМ зарегистрирована экспрессия мРНК TNF-α у животных в индуктивную фазу (6 д.п.и.) и у незаболевших и выздоровевших крыс на 30 д.п.и. Этот факт согласуется с имеющимися в литературе данными о двойственной роли TNF-α. Ранее нами было показано снижение уровня циркулирующего TNF-α у животных, получавших А в сравнении с контрольной группой. Эти данные позволяют заключить, что А снижает воспалительную реакцию в ЦНС, ингибируя высвобождение или биологические эффекты провоспалительных ЦК в крови. Полученные результаты свидетельствуют о том, что введение А в условиях индукции ЭАЭ уменьшает число животных с клиническими признаками ЭАЭ и экспрессией провоспалительных ЦК в ЦНС. Их обнаружение в СМ некоторых неболевших и выздоровевших животных позволяет предположить, что блокаторы NMDA-рецепторов глутамата моделируют переключение внутриклеточных путей сигнальной трансдукции, опосредуемых TNF-α, с нейротоксических на нейропротективные. Экспериментальные данные указывают на то, что блокада глутаматергической системы подавляет развитие неврологических симптомов при ЭАЭ, и подтверждают целесообразность применения антагонистов NMDA-рецепторов глутамата в терапии аутоиммунных демиелинизирующих процессов.

РОЛЬ БАКТЕРИЙ РОДА LACTOBACILLUS В РАЗВИТИИ КЛЕТОЧНЫХ ИММУННЫХ РЕАКЦИЙ МАКРООРГАНИЗМА

Зорина В.В., Николаева Т.Н.

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

Ведущими представителями индигенной микрофлоры человека являются бактерии рода *Lactobacillus.* Ассоциированные со слизистой оболочкой кишечника лактобактерии (ЛАБ) активируют механизмы клеточно-опосредованного и гуморального иммунного ответа, продукцию цитокинов. Усиливают цитотоксические функции Т-лимфоцитов, макрофагов и естественных киллерных (ЕК) клеток, стимулируя функции противоопухолевого иммунитета. Спектр эффектов, оказываемых ЛАБ на функции макроорганизма, обусловливает их использование в качестве основы пробиотических препаратов для профилактики и лечения острых кишечных инфекций, дисбактериозов и иммунодефицитных состояний.

Цель работы: изучить влияние бактерий рода *Lactobacillus* на клеточные факторы иммунитета, экспрессию генов и продукцию цитокинов у экспериментальных животных.

Задачи исследования: изучить влияние бактерий рода *Lactobacillus* на экспрессию генов цитокинов в клетках пейеровых бляшек (ПБ), продукцию интерферонов (IFN) и фактора, ингибирующего миграцию макрофагов (МИФ), клетками лимфоидных органов мышей СВА. Изучить влияние живых микробных клеток бактерий рода *Lactobacillus*, их гомологичных ультразвуковых лизатов и нативных фильтратов на пролиферацию спленоцитов и функциональную активность иммунокомпетентных Т- и В-лимфоцитов и ЕК-клеток селезенки экспериментальных животных.

Материалы и методы: штаммы *L.fermentum* 2998, *L.plantarum* 30, *L.plantarum* 8R-A3, *L.plantarum* 97 *L.acidophilus* NK1, *L.acidophilus* K3$^{III}_{}$24, *L.acidophilus* 100 Аш и их гомологичные ультразвуковые лизаты и нативные фильтраты.

Экспрессия генов цитокинов выявлена методом обратной транскрипции и полимеразной цепной реакции (ОТ-ПЦР). Титры IFN определялись в сыворотке крови, супернатантах клеток ПБ, селезенки и тимуса. Продукция МИФ клетками ПБ и селезенки определялась в реакции торможения миграции макрофагов (РТММ). Пролиферация спленоцитов и функциональная активность иммунокомпетентных Т- и В-лимфоцитов изучены в реакции бласттрансформации (РБТЛ). Проведен анализ цитотоксической активности ЕК-клеток селезенки.

Результаты. Анализ спектра экспрессированных генов цитокинов в клетках ПБ выявил зависимость синтеза мРНК от штамма ЛАБ. При введении *L.fermentum* 2998, *L.plantarum* 8R-A3 и *L.plantarum* 30 отмечена активация экспрессии генов IFNα и интерлейкина (IL)18 по сравнению с интактным контролем (IL6,12 и фактор некроза опухолей (TNF)α). Штамм L.acidophilus NK1 активировал синтез мРНК IFNγ. Это свидетельствует, что исследуемые штаммы ЛАБ индуцируют экспрессию генов цитокинов, опосредующих дифференцировку Т-хелперов в направлении Тх1 субпопуляции, и предполагает преимущественное развитие клеточного звена иммунного ответа.

Штаммы *L.fermentum* 2998, *L.plantarum* 30 и *L.acidophilus* NK1 стимулируют рост титров сывороточного IFN через 24 часа после перорального введения по сравнению с таковыми показателями интактного контроля. Данный временной показатель соответствует пику продукции IFNα. Штамм *L.acidophilus* NK1 вызывает рост титров IFN через 48 часов – пик продукции IFNγ. Полученные данные подтверждают результаты ПЦР-анализа, свидетельствующего о способности ЛАБ индуцировать продукцию IFNα и IFNγ. Синтез данных цитокинов отражает активацию функций клеточных факторов иммунитета: Тх1-лимфоцитов и ЕК-клеток (продуцентов IFNγ), В-лимфоцитов и клеток моноцитарно-макрофагального ряда (продуцентов IFNα).

Показано, что штаммы *L.fermentum* 2998, *L.plantarum* 30, *L.acidophilus* NK1 и *L.acidophilus* 100Аш стимулируют продукцию МИФ клетками лимфоидных органов и приводят к увеличению его количества в сыворотке крови по сравнению с аналогичными показателями интактного контроля. Отмечено увеличение индексов подавления миграции на 1-3 сутки после введения ЛАБ, что предполагает активацию клеток моноцитарно-макрофагального ряда как основных продуцентов раннего МИФ. Наибольшие значения зафиксированы на 7 сутки ($p<0,05$), что обусловлено вовлечением в процесс Тх-лимфоцитов ($CD4^+$).

Анализ пролиферативной активности интактных спленоцитов выявил зависимость показателей от штамма и дозы ЛАБ. Наибольший эффект отмечен в присутствии живых бактерий *L.acidophilus* NK1 в дозе $5x10^9$КОЕ/мл, *L.plantarum* 8R-A3 и *L.fermentum* 2998 в дозе $5x10^7$КОЕ/мл и их нативных фильтратов в дозе 10^{10}КОЕ/мл. Гомологичный ультразвуковой лизат *L.acidophilus* 100 Аш в дозе $5x10^9$КОЕ/мл вызывал максимальное увеличение показателей пролиферацию спленоцитов по сравнению с таковыми данными в контроле (($p<0,05$).

Изучено влияния живых ЛАБ и их бактериальных компонентов на функциональную активность иммунокомпетентных Т- и В-лимфоцитов селезенки, инкубируемых со специфическими митогенами. Показано что живые бактерии *L.acidophilus* NK1 и гомологичные ультразвуковые лизаты *L.acidophilus* 100Аш в дозе $1x10^9$КОЕ/мл стимулировали увеличение показателей пролиферации спленоцитов сенсибилизированных животных в присутствии Т-клеточного митогена КонА ($p<0,05$). Бактерии *L.fermentum* и *L.plantarum* вызывали усиление пролиферативной активности спленоцитов в присутствии В-митогена ЛПС. Введение животным нативных фильтратов не оказывало влияния на рост показателей пролиферации.

Таким образом, живые ЛАБ и их клеточные компоненты вызывают зависимый от штамма и дозы эффект на пролиферацию спленоцитов и усиливают функциональную активность иммунокомпетентных Т- и В-лимфоцитов.

Показано, что введение мышам живых бактерий рода *Lactobacillus* в дозе $1x10^9$КОЕ/мл стимулирует цитотоксические функции клеток селезенки. Эффект зависит от штамма ЛАБ. Наибольшую цитотоксическую активность спленоцитов индуцировали штаммы *L.plantarum* 97, *L.plantarum* 30 и *L.acidophilus* K3$^{III}_{}$24.

Таким образом, стимуляция ЛАБ функциональной активности ЕК-клеток, в первую очередь реализации цитотоксической реакции при взаимодействии с клетками-мишенями, является важным фактором противоопухолевого иммунитета и защиты макроорганизма от внутриклеточных инфекций.

Заключение. Результаты проведенных исследований выявили усиление пролиферации и функциональной активности иммунокомпетентных Т-и В-лимфоцитов, ЕК-клеток селезенки, регуляция миграционной активности

макрофагов. Активация экспрессии генов цитокинов, индукция синтеза интерферонов и МИФ являются важными механизмами иммуномодулирующего влияния ЛАБ на клеточные факторы иммунитета. Полученные данные доказывают функциональное значение ЛАБ в системе иммунологического контроля гомеостаза макроорганизма.

ИЗУЧЕНИЕ ВЛИЯНИЯ БЕСТИМА НА КЛЕТОЧНЫЙ И ГУМОРАЛЬНЫЙ ИММУНИТЕТ ЧЕЛОВЕКА *IN VITRO*

Зурочка В.А.

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

Изучали действие нового иммуномодулятора Бестим на клеточный и гуморальный иммунитет условно-здоровых доноров.

Нами был оценен иммунный статус 32 условно-здоровых лиц. Диагноз здоров был поставлен после проведенного профилактического осмотра, включавшего осмотр следующих специалистов: врач аллерголог-иммунолог, терапевт, хирург, стоматолог, эндокринолог, гинеколог, ЛОР - врач. На момент обследования все условно-здоровые лица не предъявляли каких-либо жалоб на наличие хронического или аллергического заболевания и в течение последнего месяца перед обследованием не страдали острыми респираторными заболеваниями.

Для оценки системы иммунитета материалом для исследования была выбрана цельная кровь. В опытной группе проводилась инкубации Бестима с цельной кровью (в дозе 10^{-4} мг/мл) при 37°С в течение 1 часа. В контроле добавляли физиологический раствор в таком же объеме. Затем проводили оценку иммунного статуса по уровням экспрессии CD3, CD4, CD8, CD4/CD8, CD10, CD11b, CD16, CD20, CD25, CD34, CD56, CD95, HLA-DR, показателей фагоцитоза, НСТ-теста, лизосомальной активности нейтрофилов, общей гемолитической активности и отдельных компонентов комплемента, ЦИК, IgA, IgM, IgG.

Исследование показало, что инкубация с Бестимом не оказывала никакого влияния на состав и процентное соотношение лейкоцитов периферической крови, что свидетельствует о том, что Бестим не обладает токсическим действием на клетки иммунной системы и его влияние находится в "зоне физиологического действия" препарата, не вызывая структурной перестройки клеток крови. Несколько иные данные нами были получены при оценке фагоцитарной активности нейтрофилов и моноцитов периферической крови. Одночасовая инкубация с Бестимом приводила к активации лизосомальной активности нейтрофилов и моноцитов и незначительной стимуляции индуцированной НСТ – реакции нейтрофилов.

При изучении экспрессии CD рецепторов лимфоцитов периферической крови нами было выявлено, что Бестим незначительно снижал экспрессию CD3 рецептора лимфоцитов, увеличивая при этом экспрессию рецепторов В-лимфоцитов, несущих IgM (CD10), CD 16 – рецептор нейтрофилов и NK клеток, CD34 – рецептор, маркирующий незрелые клетки гранулоцитарно-макрофагального ряда, и HLA-DR – главного комплекса гистосовместимости, особенно Бестим влиял на экспрессию CD11b (рецептор к комплементу). В то же время он не влиял на активность FAS – рецептора лимфоцитов (CD95) и основные субпопуляции лимфоцитов (CD4, CD8, CD20, CD56). Так же, часовая инкубация с Бестимом приводила к снижению уровней IgA, IgM, IgG, ЦИК, гемолитической активности комплемента и, особенно, его С5 фрагмента.

Полученные данные, на наш взгляд, укладываются в единый механизм действия Бестима, а именно активацию фагоцитарных клеток через рецептор CD11в (рецептор к комплементу). В результате чего увеличивается связывание иммунных комплексов (которые сами являются активаторами комплемента), усиливается опсонизация и поглощение иммунных комплексов через рецепторы к активным фрагментам комплемента, повышается метаболическая активность фагоцитов, что ведет к утилизации иммунных комплексов и, как следствие, мы видим падение ЦИК, IgA, IgM, IgG, которые находятся в составе иммунных комплексов. Все это сопровождается потреблением комплемента.

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства образования и Правительства Челябинской области.

ВЛИЯНИЕ НЕЙТРОФИЛОКИНОВ НА ИММУНОРЕГУЛЯТОРНУЮ АКТИВНОСТЬ Т-ЛИМФОЦИТОВ В ОДНОНАПРАВЛЕННОЙ СМЕШАННОЙ КУЛЬТУРЕ В ПРОЦЕССЕ ФОРМИРОВАНИЯ ПРОТИВОЧУМНОГО ИММУНИТЕТА

Иванова И.А., Васильева Г.И., Беспалова И.А., Киселева А.К., Дорошенко Е.П., Мишанькин М.Б.

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

Введение. В начале 90-х годов появились публикации, свидетельствующие о том, что нейтрофилы (Нф) продуцируют растворимые биологически активные низкомолекулярные пептидные факторы, способные регулировать функции ряда клеток (Долгушин и др., 1995-2005; Васильева и др.,1997-2005). Эти факторы называют нейтрофилокинами (НК) и относят к гетерогенной группе регуляторных пептидов – цитокинам.

Цель нашего исследования заключалась в изучении способности НК, индуцированных микробными клетками (м.к.) *Yersinia pestis EV*, модулировать функциональную активность лимфоцитов (Лф) в процессе формирования противочумного иммунитета.

Материалы и методы. Исследования выполняли на перитонеальных Нф беспородных мышей, интактных или иммунизированных м. к. *Y. pestis EV* линии НИИЭГ (в дозе 1 млн м.к.). В качестве индуктора синтеза НК использовали м.к. *Y. pestis EV* в дозе 10 м.к. на Нф, в качестве контроля - 0,15 М раствор NaCl. Длительность инкубирования Нф с указанными препаратами составляла 4 ч. Супернатанты, содержащие естественный комплекс НК (ЕКНК), получали центрифугированием культур клеток при 1000 g в течение 10 мин с последующим фильтрованием через мембранные фильтры с диаметром пор 0,22 мкм. Уровень цитокинов определяли методом твердофазного иммуноферментного анализа с помощью моноклональных антител к различным цитокинам (Pharmingen, USA; Caltag, Canada) (Котов,1990). Влияние ЕКНК на иммунорегуляторную активность Т-лимфоцитов изучали в однонаправленной смешанной культуре лимфоцитов, используя клетки, полученные от интактных и иммунизированных беспородных мышей. К культуре лимфоцитов добавляли в соотношении 1:5 Т-лимфоциты, полученные от интактных и иммунных животных. Т-лимфоциты выделяли методом «пэннинга» на пластиковых чашках Петри общепринятым

способом, дополнительно очищали на колонках с нейлоновой ватой и обрабатывали в течение 3 ч митомицином С в концентрации 2-10 мкг/мл для блокады их пролиферации, но сохранения синтетической активности. В дублирующие культуры дополнительно к лимфоцитам, полученным от иммунных животных, вносили ЕКНК, синтезированный Нф интактных и иммунных мышей, оценивая роль медиаторов нейтрофильного происхождения в нейтрофильно-лимфоцитарной регуляции иммунного ответа по их влиянию на пролиферацию тест-лимфоцитов.

Основные результаты. Результаты проведенных исследований свидетельствуют о том, что лимфокины (ЛК) иммунных мышей обеспечивают при первичном иммунном ответе статистически значимое увеличение пролиферации тест-культуры, в то время как ЛК интактных животных таким эффектом не обладают. При этом введение в модельную систему ЕКНК, синтезируемого Нф как интактных, так и иммунных мышей, обеспечивает дополнительное увеличение пролиферации тест-лимфоцитов, однако стимулирующий эффект более выражен у иммунных. При моделировании вторичного иммунного ответа показано, что ЛК интактных мышей не оказывают стимулирующего влияния на тест-лимфоциты, полученные от иммунных животных, которые самостоятельно развивают выраженный иммунный ответ при вторичном контакте с антигеном, в то время как ЛК иммунных мышей осуществляют дополнительное стимулирующее влияние на пролиферацию иммуноцитов, уровень которой становится в 1,74 раза больше, чем в контроле. Исследование возможной дополнительной стимуляции со стороны ЕКНК на пролиферацию лимфоцитов иммунных животных при вторичном контакте с антигеном показало, что в этом случае ЕКНК, синтезируемый Нф иммунных мышей, в отличие от интактных, значительно усиливает пролиферацию тест-культуры.

Заключение. Результаты наших исследований свидетельствуют о том, что ЕКНК, синтезируемый Нф интактных и иммунизированных мышей, стимулирует иммунорегуляторную активность Т-лимфоцитов в однонаправленной смешанной культуре лимфоцитов, особенно при вторичном иммунном ответе.

НОВЫЙ МЕТОД ИНДУКЦИИ $CD4^+CD25^+$Treg ЛИМФОЦИТОВ ГЕНЕТИЧЕСКИ МОДИФИЦИРОВАННЫМИ ДЕНДРИТНЫМИ КЛЕТКАМИ

Иком Т.Е.[1], Попов И.А.[1], Олейник Е.К.[2]

[1]Отделение хирургии Университета Вестерн Онтарио, Лондон, Онтарио, Канада;

[2]Институт биологии Карельского Научного Центра РАН, Петрозаводск, Россия

Дендритные клетки (ДК) способны индуцировать Th1- или Th2-ответ в зависимости от особенностей стимулирования. В настоящей работе представлен новый метод переключения иммунного ответа от Th1 к Th2 с помощью иммунной модуляции *in vivo* трансфекцией siRNA (short interference RNA). Известно, что экзогенная siRNA индуцирует РНК-интерференцию (РНКи), проявляющуюся в уничтожении РНК-транскриптов, гомологичных введенной двунитчатой РНК. Поэтому, чтобы получить специфическую супрессию генов, используется siRNA, соответственно подобранные и синтезированные к определенному гену. В случае трансфекции siRNA в клетки иммунной системы они выступают в роли иммуномодулирующего агента.

IL-12 является главным Th1 ассоциированным цитокином, секретируемым ДК в процессе иммунной активации. Это гетеродимер, состоящий из двух субъединиц: p35- и p40. В связи с тем, что p40 может формировать гомодимер и образовывать подобие иммунного супрессивного цитокина, мы сосредоточили наше внимание на субъединице p35, которая является иммуностимуляторной. Было продемонстрировано, что введение IL-12p35-специфических siRNA дуплексов в ДК выключало ген IL-12p35, не влияя при этом на ген IL-12p40. Подавление гена было достаточно четким, и его выключение более чем на 99% наблюдалось при пикомолевом уровне концентрации siRNA. Введение siRNA не индуцировало созревания в незрелых ДК, а зрелые ДК не изменяли способность экспрессировать CD40, CD80 и CD86, что обозначает селективность эффекта выключения для определенного гена. В результате выключения гена IL-12p35 в ДК было обнаружено повышение продукции иммуносупрессорного цитокина IL-10.

В экспериментах *in vivo* была подтверждена иммунная модуляция при использовании ДК, обработанных siRNA. После того, как ДК с выключенной продукцией IL-12p35 были праймированы антигеном KLH (гемоцианин улитки) и введены интактным сингенным мышам, наблюдалась более низкая пролиферация Т клеток, чем в ответе на их стимуляцию KLH *in vitro*. Подтверждением нашего предположения о том, что эти генетически модифицированные ДК обладают свойством изменять направленность иммунного ответа, стали данные другого эксперимента. По сравнению с контролями Т-клетки мышей, получавших обработанные антигеном KLH ДК с выключенным геном IL-12p35, продуцировали *in vitro* высокие уровни цитокинов Th1 и низкие уровни цитокинов Th2 после рестимуляции тем же антигеном. При культивировании модифицированных ДК с аллогенными интактными Т-лимфоцитами было обнаружено большое количество $CD4^+CD25^+CTLA\text{-}4^+$ T-reg клеток. Эти Treg лимфоциты обладали супрессорным свойством и по отношению к сингенным Т-клеткам. Таким образом, данные результаты позволяют предполагать, что *in vivo* модифицированные ДК могут индуцировать $CD4^+CD25^+$ Treg клетки.

$HspBP_1$ ЗАЩИЩАЕТ КЛЕТКИ ОТ ЦИТОТОКСИЧНОЙ АКТИВНОСТИ КОМПЛЕКСА Tag7-Hsp70

Кабанова О.Д., Духанина Е.А.[1], Лукьянова Т.И., Шаталов Ю.В., Яшин Д.В., Гнучев Н.В.

Институт биологии гена РАН,Москва, Россия;

[1]Институт молекулярной биологии РАН, Москва, Россия.

$HspBP_1$ принадлежит к семейству эукариотических белков, являющихся факторами нуклеотидного обмена Hsp70. $HspBP_1$ ингибирует цитотоксическую активность недавно охарактеризованного комплекса пептидогликан узнающего белка Tag7 с белком теплового шока Hsp70. $HspBP_1$ способен связываться не только с АТФазным доменом Hsp70, но и Tag7, при этом образуется стабильный тройной комплекс Tag7-Hsp70-$HspBP_1$, не обладающий цитотоксичностью. 1 mM АТФ не связывает диссоциацию $HspBP_1$ из комплекса и не реактивирует цитотоксическую активность Tag7-Hsp70 комплекса. В системах *in vivo*

$HspBP_1$ также взаимодействует и с Hsp70, и с Tag7. Так, в клетках CSML-O с высокой экспрессией Tag7 последний секретируется в культуральную среду в комплексе с $HspBP_1$ и не проявляет цитотоксической активности. В цитозоле этих же клеток обнаружен комплекс Tag7-Hsp70-$HspBP_1$, также не обладающий цитотоксичностью. Инкубация цитотоксических белков, секретированных ЛАК клетками, с клетками L-929 в присутствии $HspBP_1$ приводила к резкому снижению их цитотоксичности. $HspBP_1$ широко представлен в опухолевых клетках, комплекс Tag7-$HspBP_1$ обнаружен в сыворотке человека. Возможно, одна из функций этого белка связана с защитой клетки и организма от цитотоксического действия комплекса Tag7-Hsp70.

ЭКСПРЕССИЯ ИММУНОЛОГИЧЕСКИХ, АПОПТОТИЧЕСКИХ И АНГИОГЕННЫХ МАРКЕРОВ НА PEL-КЛЕТКАХ

Кадырова Е.Л., Лукашина М.И.

РОНЦ им Н.Н.Блохина АМН, Москва, Россия

Наиболее ранними событиями в канцерогенезе являются изменения экспрессии поверхностных антигенных комплексов (АГ) на трансформированных клетках, а также нарушения процессов пролиферации и апоптоза. Две широко используемые суспензионные линии BCBL-1 и BC-3 были получены из выпотов ВИЧ-негативных больных PEL (*primary effusion lymphoma*); их клетки (В-лимфоциты) моноинфицированы HHV-8, этиологическим агентом PEL и являются моделью для изучения вирусного канцерогенеза. Анализ литературных данных показал, что эти клеточные линии недостаточно охарактеризованы по экспрессии АГ, а также апоптотических и ангиогенных клеточных маркеров, что и стало целью наших исследований. Методы: 1. иммунопероксидазный авидин-биотиновый метод (ИГХ) с использованием парафиновых срезов, содержащих BCBL-1 клетки; 2. флюорометрический анализ (ФА) обеих линий. Моно- и поликлональные антитела к: CD3, CD4, CD5, CD8, CD10, CD13, CD14, CD16, CD20, CD25, CD34, CD38, CD45, CD54, CD71, HLA-DR, а также Ki67, p53, BAX, bcl2, FASL, FASR (CD95), VEGFA, VEGFR1 (Flt1), VEGFR2 (Flk1/KDR), VEGFR3 (Flt4), литическому белку HHV-8 K8.1. Дополнительно получена стандартная оценка степени апоптоза тест-клеток по пропидию йодиду (PI).

Результаты. Обе линии принадлежат к В-лимфоцитам поздней стадии дифференцировки (плазматические клетки): отсутствовала экспрессия CD Т-и В- ряда (CD3, CD5, CD8, CD16, CD20), миеломоноцитарных (CD13, CD14), стволоклеточного CD34, лимфоплазмацитарного CD38 и других (CD10, CD45). В линии BCBL-1, в отличие от мономорфной BC-3, обнаружено четкое разделение на две морфологически разные фракции, на которых выявлена разная экспрессия одних маркеров. На мелких клетках BCBL-1, слабо пролиферативных (10-15% с Ki67), был экспрессирован маркер плазматических клеток CD38 (43,7%), но меньше, чем на клетках BC-3 (87,0%), где были выявлены также высокие экспрессии HLA-DR (23,7%) и маркера адгезии CD54 (59,7%). 80% этой фракции BCBL-1 были ИГХ-позитивны к антиапоптотическому фактору bcl2, а также проапоптотическим белкам разных сигнальных путей - BAX, эффектору p53, (20-25%) и CD95 (более 50%). На крупных пролиферативно активных (75% с Ki67) и инфицированных HHV-8 (10-15% только этой фракции BCBL-1 содержат литический вирусный белок K8.1), указанные выше CD были не экспрессированы или слабо выражены (проапоптотические p53, BAX). Стандартный показатель апоптоза в ФА (с PI) был также высокий. В крупных клетках BCBL-1 была выявлена экспрессия VEGFR1 (рецептора VEGF-A).

Заключение. На PEL-клетках *in vitro*, моноинфицированных HHV-8, показано изменение экспрессии поверхностных АГ, достаточно высокий уровень апоптоза и экспрессии одного из ангиогенных маркеров - R1-рецептора VEGF-A, активация которого, по-видимому, происходит, по паракринному механизму, а также обнаружена морфологическая, функциональная и пролиферативная неоднородность линии BCBL-1. Возможно, только ее крупные клетки являются истинно злокачественными, а мелкие - нормальными В-лимфоцитами; доказательство этого, а также оценка трансформирующего потенциала клеток разных фракций предполагается провести в дальнейшем.

АКТИВАЦИЯ МОНОНУКЛЕАРОВ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ ФРАГМЕНТАМИ ТРАНСКРИБИРУЕМОЙ ОБЛАСТИ РИБОСОМНОГО ГЕНА ЧЕЛОВЕКА *IN VITRO*

Калашникова Е.А., Вейко Н.Н., Кокаровцева С.Н., Костюк С.Н., Ермаков А.В., Еголина Н.А., Ляпунова Н.А., Спитковский Д.М.

ГУ Медико-генетический научный центр РАМН, Москва, Россия

Анализ первичной последовательности транскрибируемой области рибосомного повтора (ТОрДНК) человека выявил наличие большого количества неметилированных CpG – мотивов ДНК. В этом отношении ТОрДНК очень похожа на бактериальную ДНК, которая, как известно, взаимодействует с соответствующими Toll-like рецепторами 9 (TLR9) антиген-презентирующих клеток. В предыдущей работе мы описали интересное свойство фрагментов ТОрДНК накапливаться в пуле внеклеточной ДНК в плазме крови, другие фрагменты которой довольно быстро разрушаются нуклеазами. Увеличение содержания во внеклеточной ДНК организма фрагментов ТОрДНК может оказаться небезразличным для иммунной системы.

Целью настоящей работы являлся сравнительный анализ активации мононуклеаров периферической крови (МПК) человека, культивируемых в присутствии различных фрагментов ДНК: ТОрДНК, ДНК *E.coli* и тотальной геномной ДНК (тотДНК) человека. Активация лимфоцитов определялась по двум признакам: (1) изменению в структуре хроматина ядер и ядрышка и (2) изменению количества синтезируемого МПК цитокина - TNF-α.

Методы. Все образцы ДНК подвергали одинаковой дополнительной очистке: последовательной обработке тритоном X-114, электрофорезу в 1 % легкоплавкой агарозе и гельфильтрации на носителе HW-85. Анализ изменений в структуре хроматина определяли по положениею прицентромерных локусов 1-й хромосомы (район 1q12) в фиксированных ядрах лимфоцитов с помощью гибридизации *in situ* с биотинированным зондом на 1q12. Для оценки изменения активности ядрышка определяли число ядрышек и их суммарную площадь после окраски азотнокислым серебром. Изображения анализировали с помощью программы IBAS и программы фирмы «ИнтерЭВМ» (Москва). Активность TNF-α в надосадках МПК (в МЕ/мл) определяли по степени лизиса чувствительных

к этому цитокину клеток мышиной фибросаркомы L-929, выявляемого с помощью окраски живых клеток МТТ.

Результаты. Результатом действия ТОрДНК на популяцию лимфоцитов является изменение структуры хроматина в первые часы культивирования в большом числе клеток, которое выражается в перемещении прицентромерных локусов 1-й хромосомы от мембраны внутрь ядра и в увеличении числа окрашиваемых серебром фибриллярных центров ядрышка и их площади. Активация сопровождается увеличением продукции TNF-α. При действии ТОрДНК, по сравнению с бактериальной ДНК, структурная перестройка хроматина и активация ядрышка наблюдаются раньше (уже через 30-60 мин), в заметно большем числе клеток и при меньших концентрациях фрагментов ДНК. Продукция TNF-α в присутствии ТОрДНК через 4 и 24 часа в 2,5 - 4 раза выше, чем в контроле, но в 3 раза ниже, чем при культивировании лимфоцитов с ДНК *E.coli*. Тотальная ДНК человека не стимулирует МПК.

Выводы. Полученные экспериментальные данные показали, что неметилированная CpG-богатая последовательность ТОрДНК человека обладает свойством стимулировать *in vitro* мононуклеары периферической крови. Сравнительный анализ стимулирующего действия одинаковых количеств ДНК *E.coli*, тотальной геномной ДНК и ТОрДНК человека на МПК выявил существенные различия.

МИГРАЦИЯ ЭФФЕКТОРНЫХ ЛИМФОЦИТОВ CD4 В ЛЕГОЧНУЮ ТКАНЬ ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ТУБЕРКУЛЕЗНОЙ ИНФЕКЦИИ

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

ГУ ЦНИИ Туберкулеза РАМН, Москва, Россия

Протективный иммунный ответ при микобактериальных инфекциях зависит в первую очередь от активности лимфоцитов $CD4^+$, продуцирующих IFNγ и активирующих антимикобактериальную функцию макрофагов. В связи с этим изучение миграции эффекторных лимфоцитов и их распределения между лимфоидными органами и периферическими тканями представляет несомненный интерес. Известно, что дифференцировка эффекторных клеток из наивных Т-лимфоцитов инициируется в лимфатических узлах. В процессе дифференцировки лимфоциты пролиферируют, изменяют экспрессию ряда поверхностных молекул и приобретают эффекторные функции, в частности, способность к продукции IFN-γ. Не ясно, однако, на каком этапе дифференцировки Т-лимфоциты приобретают способность к миграции в периферические ткани, в том числе, в легкие. Мы исследовали зависимость миграции эффекторных Т лимфоцитов в легочную ткань от их поверхностного фенотипа (степени дифференцированности) на модели экспериментальной туберкулезной инфекции.

Исследования проводили на мышах линии C57BL/6, инфицированных внутривенно вирулентными *M.tuberculosis* штамма H37Rv. У таких мышей получали клетки селезенки и с помощью магнитного сортинга клеток выделяли из них две субпопуляции лимфоцитов – $CD4^+$ $CD27^+$ и $CD4^+$ CD27-. Ранее нами было показано, что данные субпопуляции различаются по степени дифференцированности: высокодифференцированные эффекторы, продуцирующие IFNγ, относятся к популяции CD27-. Выделенные клетки метили красителем CFSE и переносили сингенным реципиентам. Через 18 часов после адоптивного переноса определяли процентное содержание и поверхностный фенотип донорских клеток в периферических и лимфоидных тканях реципиентов.

Проведенные исследования показали, что лимфоциты $CD27^+$ мигрировали как в лимфоидные органы, так и в легкие, в то время как лимфоциты $CD27^-$ накапливались преимущественно в легких, в меньшей степени – в селезенке и практически не определялись в лимфатических узлах.

При адоптивном переносе клеток $CD27^+$ содержание клеток донора составило: в лимфатических узлах – 1% от всех лимфоцитов $CD4^+$, в селезенке –1,4%, в легких – 0,3 %. Анализ поверхностного фенотипа клеток донора показал, что основная часть лимфоцитов $CD27^+$ мигрировавших в лимфатические узлы (94%), сохраняла высокий уровень экспрессии молекул CD27 и имела фенотип "наивных "клеток ($CD62L^+CD27^+$). В отличие от них часть лимфоцитов, попавших в легкие (20%), снижали экспрессию молекул CD27 и приобретали фенотип CD27-.

При переносе лимфоцитов $CD27^-$, их содержание в лимфатических узлах составляло всего 0,06 %, в селезенке – 0,7%, а в легких – 1,2%. При этом перенесенные клетки не меняли свой исходный фенотип и сохраняли низкий уровень экспрессии молекул CD27 во всех исследованных органах.

Таким образом, полученные нами данные свидетельствуют о том, что окончательная дифференцировка эффекторных лимфоцитов может происходить в инфицированной легочной ткани и обеспечивать локальную протекцию при микобактериальных инфекциях.

ЭПИТЕЛИАЛЬНЫЕ КЛЕТКИ ТИМУСА И ПИНЕАЛОЦИТЫ: СТРУКТУРНОЕ СХОДСТВО И ФУНКЦИОНАЛЬНОЕ ЕДИНСТВО

Кветной И.М., Полякова В.О.

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

Тимус и пинеальная железа (эпифиз) являются органами, в которых наиболее ярко проявляются тесные молекулярные и клеточные нейроиммуноэндокринные взаимодействия, играющие ключевую роль в обеспечении как локальных, так и общерегуляторных биологических эффектов. В последние годы было показано, что пинеалоциты и эпителиальные клетки тимуса (ЭКТ) экспрессируют целый ряд одинаковых сигнальных молекул, обеспечивающих необходимый молекулярный коммуникационный диалог, направленный на обеспечение физиологических процессов в живом организме.

В связи с этим **целью** работы явилось изучение структурно-функциональной организации пинеалоцитов и ЭКТ. Объектом исследования послужили культуры ТЭК и пинеалоцитов крыс линии Wistar. Экспрессию в клетках мелатонина, серотонина, вазоактивного интестинального пептида, кальций-ген-родственного пептида, эндотелина-1 и белка β-CREB осуществляли иммуноцитохимическим методом с применением соответствующих моноклональных антител и наборов хромогенов (Dako, Novocastra). Интенсивность реакции оценивалась морфометрически с применением системы компьютерного анализа микроскопических изображений Nikon и лицензионной программы Videotest Morphology 4.0. Электронномикроскопическое исследование проводили на ультратонких срезах культур клеток, залитых в смесь эпонов в микроскопе JEOL-100B.

Результаты исследования показали сходство ультраструктуры ТЭК и пинеалоцитов – в обоих типах клеток содержится округлое ядро с выраженным гетерохроматином, цитоплазма клеток богата различными органеллами, хорошо развит эндоплазматический ретикулум, пластинчатый комплекс активизирован, выявляется большое число митохондрий и рибосом. Цитоплазма ТЭК и пинеалоцитов богата электронно-плотными секреторными гранулами округлой и бобовидной формы, некоторые из которых находятся в состоянии экзоцитоза.

В ТЭК и пинеалоцитах зарегистрирована выраженная экспрессия мелатонина, серотонина, вазоактивного интестинального пептида, кальций-ген-родственного пептида, эндотелина-1 и белка β-CREB. По показателям оптической плотности и площади экспрессии наиболее активно в тех и других клетках протекает синтез и секреция мелатонина, серотонина и кальций-ген-родственного пептида. Выраженная экспрессия белка β-CREB в клетках тимуса и пинеальной железы свидетельствует об активном синтезе в них мелатонина и его участии в качестве сигнальной молекулы межклеточных взаимодействий, действующей как эндокринным, так и паракринным путем.

Полученные данные отражают структурно-функциональное единство ТЭК и пинеалоцитов. Синтез и секреция в них гормонов общерегуляторного действия свидетельствует об их ключевой роли как клеточных компартментов диффузной нейроиммуноэндокринной системы, имеющей важное значение в поддержании гомеостаза живого организма на уровне, соответствующем его генетическому, эволюционному и возрастному статусу.

ВЛИЯНИЕ ИММУНОМОДУЛЯТОРОВ БАКТЕРИАЛЬНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ НА РЕЗИСТЕНТНОСТЬ К РАЗЛИЧНЫМ ПАТОЛОГИЧЕСКИМ ВОЗДЕЙСТВИЯМ

Кирилличева Г.Б., Соловьева М.С., Белоусова Л.С., Плоскирева А.А.[1]

ГУ НИИЭМ им. Н.Ф.Гамалеи РАМН, г. Москва;

[1]ФГУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора, г. Москва

В последние годы во врачебной практике все чаще используют различные иммуномодуляторы. Средствами массовой информации формируется мнение о целесообразности широкого применения этих препаратов, которые характеризуются как средства, повышающие неспецифическую резистентность к различным патологическим воздействиям.

Целью настоящего исследования явилось изучение влияния иммуномодуляторов бактериального происхождения на резистентность к различным патологическим воздействиям.

В ходе работы проводилось изучение иммуномодуляторов бактериального происхождения (пирогенала, сальмозана, стафилококкового анатоксина, стрептопептида и др.)

В качестве патологического воздействия использовали вирусные и бактериальные инфекции, ионизирующее излучение, действие бактериальных токсинов. Исследование проводилось на мышах инбредных линий: мыши-самцы линий СВА, С57BL/6, Balb/c, NFS массой 16-18 г в возрасте 3 месяцев, полученных из питомника «Столбовая».

В ходе исследования применен адаптационно-биоритмологический подход к оценке иммуномодулирующего эффекта. Суть метода заключается в изучении воздействия иммуномодуляторов в различные фазы биологического ритма изучаемого показателя и дифференциации специфического и неспецифического эффекта препаратов.

Экспериментально доказано, что оценка иммуномодулирующего эффекта должна проводиться с позиции единой общебиологической концепции о гомеостазе и в соответствии с существующей классификацией адаптационных реакций и иерархических уровней регуляции. В ходе исследования показана возможность применения иммуномодуляторов бактериального происхождения в качестве средств патогенетической терапии при инфекционных заболеваниях.

Показано, что действие исследуемых иммуномодуляторов бактериального происхождения в одной и той же дозе может не только повышать, но и снижать резистентность к различным патологическим воздействиям. Направленность иммуномодулирующего эффекта определяется исходной чувствительностью животных к патологическому воздействию. Иммуномодуляторы вызывают повышение резистентности лишь в случае исходной чувствительности к изучаемому патологическому воздействию. Напротив, снижение резистентности наблюдается при исходно низкой чувствительности к изучаемому патологическому воздействию.

Полученные данные имеют важное практическое значение. Они свидетельствуют о том, что иммуномодуляторы бактериального происхождения не могут быть средствами широкого применения, что требует индивидуализационных подходов в их назначении.

На основе полученных данных разработаны подходы к индивидуальному назначению иммуномодуляторов бактериального происхождения.

ПРОБЛЕМА J-ЦЕПИ ИММУНОГЛОБУЛИНОВ

Климович Б.В., Самойлович М.П., Климович В.Б.

Центральный научно-исследовательский рентгенорадиологический институт, Санкт-Петербург, Россия

Впервые J-цепь была идентифицирована как субъединица секреторного IgA. Позднее было установлено, что она представляет собой кислый полипептид с молекулярной массой около 15 кДа (137 АКО), который входит в состав секреторных IgM и IgA. До сих пор J-цепь не удалось отнести к какому-либо семейству известных белков. J-цепь считают важным компонентом системы иммунитета слизистых оболочек млекопитающих. Она принимает участие в сборке димеров IgA и пентамеров IgM и в связывании их с рецептором эпителиальных клеток, обеспечивающим перенос IgA и IgM в секреты экзокринных желез и на поверхности слизистых. J-цепь выявлена у представителей всех классов позвоночных животных, начиная с хрящевых рыб. Сравнение нуклеотидных последовательностей генов J-цепей млекопитающих, птиц, амфибий, рептилий и рыб показало, что J-цепь является консервативным белком со степенью межвидовой гомологии от 33 до 80%. J-цепь была обнаружена в цитоплазме ранних предшественников Т- и В-лимфоцитов, не продуцирующих Ig. В клетках эмбриональной печени человека J-цепь выявляется раньше, чем начинается экспрессия гена мю-цепи. Эти факты поставили вопрос о филогенетическом возрасте J-цепи, о наличии гомологов этого белка у животных, не продуцирующих Ig, и о функциях древнего предшественника J-цепи.Данные о наличии генов-гомологов J-цепи у беспозвоночных животных, в том числе у кольчатых червей, иглокожих, моллюс-

ков, членистоногих, оболочников и круглоротых, были опубликованы в 1996 году [Takahashi T. et al., PNAS, 1996, V. 93, P. 1886-1991]. В течение последующих пяти лет эти результаты широко цитировались и обсуждались в обзорах и в статьях, посвященных изучению J-цепей курицы, черепахи, лягушки. Однако работ, воспроизводящих или развивающих данные о присутствии гомологов J-цепи у беспозвоночных, опубликовано не было. В статье, посвященной изучению J-цепи акулы, сопоставление нуклеотидных последовательностей генов J-цепи ряда позвоночных животных показало, что структура J-цепи земляного червя (по данным статьи 1996 года) ближе к J-цепи человека и мыши, чем к J-цепям курицы, лягушки, акулы и других позвоночных. Поскольку это противоречит представлениям о степени эволюционного родства между перечисленными видами, указано на необходимость пересмотра данных о наличии J-цепи у земляного червя и других беспозвоночных.Таким образом, в проблеме J-цепи иммуноглобулинов появился новый аспект. Прежде основные нерешенные вопросы касались функций этого белка, его происхождения и принадлежности к тому или иному белковому семейству. В настоящее время оказались также открытыми вопросы об эволюционном возрасте J-цепи и о видах животных, у которых этот белок впервые появился.Работа выполняется при финансовой поддержке РФФИ (грант 05-04-48860).

АКТИВИРУЮЩЕЕ ДЕЙСТВИЕ БЕЛКОВ ТЕПЛОВОГО ШОКА 70 кДа НА NK-КЛЕТКИ ЧЕЛОВЕКА

Коваленко Е.И., Власкин П.А., Каневский Л.М., Стрельникова Ю.И., Сапожников А.М.

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

Белки теплового шока (БТШ) являются потенциальными активаторами клеточного иммунитета. Они, в частности, способны взаимодействовать с антиген-презентирующими клетками, вызывая их активацию и продукцию цитокинов. По данным последних лет, БТШ70 могут служить активирующим стимулом для натуральных киллеров (NK-клеток), двумя основными функциями которых является лизис поврежденных клеток и регулирование реакций врожденного и адаптивного иммунитета путем продукции цитокинов. Однако механизмы активации NK-клеток БТШ до сих пор не известны. Пока не ясно, взаимодействуют ли БТШ70 непосредственно с NK-клетками, либо они влияют опосредованно, активируя другие звенья системы врожденного иммунитета. В задачу данной работы входило изучение действия БТШ70 на цитолитическую активность натуральных киллеров и продукцию гамма-интерферона (IFN-γ) с использованием высокоочищенных популяций NK-клеток человека. Для выделения NK-клеток из фракции мононуклеаров человеческой крови были использованы методы магнитной сепарации и клеточного сортинга. Содержание клеток $CD3^-CD16^+CD56^+$ в выделенных популяциях составляло не менее 95%. Продукцию IFN-γ измеряли с помощью иммуноферментного анализа и путем внутриклеточного окрашивания с применением проточной цитометрии. Цитотоксичность оценивали по уровню активации каспазы-6 в клетках-мишенях методом проточной цитометрии. В работе использовали рекомбинантный человеческий БТШ70 с пониженным содержанием эндотоксина ("Stressgen"). Было показано, что прединкубация NK-клеток с БТШ70 (5 мкг/мл) в течение 1-18 часов приводит к усилению их цитотоксической активности на 15-20%. При этом БТШ70, сам по себе, не вызывал продукцию IFN-γ в неактивированных NK-клетках, но оказывал костимулирующее действие на продукцию IFN-γ, индуцированную IL-2. Затем NK-клетки с помощью клеточного сортинга были разделены на субпопуляции $CD3^-CD16^+CD56^+$ и $CD3^-CD16^-CD56^+$. Высокопродуцирующая IFN-γ субпопуляция $CD3^-CD16^-CD56^+$ оказалась более чувствительной к действию БТШ70 по сравнению с популяцией $CD3^-CD16^+CD56^+$. С использованием комбинации тестов, включающей анализ действия чистого LPS в данной экспериментальной системе, обработку клеток полимиксином Б и высокотемпературную обработку препарата БТШ70, показано, что обнаруженный эффект БТШ70 не зависит от LPS. В сумме полученные данные свидетельствуют в пользу того, что БТШ70 непосредственно взаимодействует с NK-клетками человека, увеличивая как их цитолитическую активность, так и продукцию этими клетками IFN-γ. Исследования проводятся при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 04-04-49477).

ИММУННЫЙ ОТВЕТ В ЛЕГКИХ МЫШЕЙ ГЕНЕТИЧЕСКИ ЧУВСТВИТЕЛЬНЫХ И РЕЗИСТЕНТНЫХ К ЗАРАЖЕНИЮ *M.AVIUM*

Кондратьева Е.В., Мищенко В.В., Пичугин А.В., Авербах М.М.

ЦНИИ туберкулеза РАМН, Москва

Введение. Данные мировой литературы свидетельствуют о том, что патология, обусловленная *M.avium*, не смотря на незначительную частоту по сравнению с инфекциями, вызванными *M.tuberculosis*, требует дальнейшего углубленного экспериментального и клинического изучения. В частности, мало известно об особенностях иммунного ответа при инфекции *M.avium* в зависимости от фенотипа макроорганизма. Ранее были выявлены линии инбредных мышей C57BL/6 и BALB/C, чувствительные и линии A/Sn и DBA/2 резистентные к внутривенному заражению *M. Avium*.

Целью настоящего исследования явилось изучение в динамике состава клеток, инфильтрирующих легкое в результате инфекционного процесса, вызванного аэрогенным введением штамма *M.avium* 724 R на инбредных мышах линий C57BL/6 (чувствительных к *M.avium*) и I/St (чувствительных к *M.tuberculosis*).

Материал и методы. В работе были использованы две линии мышей – I/St и C57BL/6 (B6), соответственно, резистентные и чувствительные к *M.avium* – выращенные в питомнике ГУЦНИИТ РАМН в стандартных условиях. Мышей заражали аэрогенно в камере культурой *M.avium*, выращенной на полной жидкой среде Дюбо в стандартных условиях. В камеру помещалось 10 мл суспензии *M.avium*, содержащей 8 $x10^6$ КОЕ /10 мл. Для контроля за попаданием микобактерий в легкие высевали гомогенаты легких через 24 ч после инфицирования. Было показано, что доза заражения составляет в среднем $2,4x10^3$ КОЕ/мышь.

Проточная цитофлуорометрия. Для характеристики иммунного ответа исследовали субпопуляции клеток легкого в динамике. Для этого исследуемые клетки (3-$5x10^6$ на пробу) инкубировали с меченными моноклональными антителами, специфичными к различным поверхностным

КОЛИЧЕСТВЕННЫЙ СОСТАВ СУБПОПУЛЯЦИЙ ЛИМФОИДНЫХ КЛЕТОК В ЛЕГКИХ МЫШЕЙ ЛИНИЙ I/ST И B6 ПОСЛЕ АЭРОГЕННОГО ЗАРАЖЕНИЯ *M.avium*

Клеточные маркеры	недели	Количество клеток x 10^6 в легком		Т-критерий Стьюдента, p
		I/St	B6	
Общее количество клеток	3	12,00±1,00	18,83±0,83	<0,006
	8	13,07±1,47	106,67±7,45	<0,0002
	16	34,7±1,45	67,00±5,69	<0,005
Лимфоциты	3	3,60±0,64	6,63±0,07	<0,009
	8	4,10±0,31	43,40±1,87	<0,00003
	16	10,02±1,02	12,7±3,34	-
$CD4^+$ Т-лимфоциты	3	1,03±0,26	1,10±0,10	-
	8	1,12±0,22	13,00±1,47	<0,001
	16	3,28±0,39	3,45±1,31	-
$CD8^+$ Т-лимфоциты	3	0,60±0,06	1,02±0,04	<0,004
	8	1,25±0,25	8,43±0,64	<0,0004
	16	2,02±0,35	1,41±0,36	-
$CD19^+$ В-лимфоциты	3	0,32±0,17	1,4±0,10	<0,005
	8	0,25±0,17	7,17±0,15	<0,000007
	16	2,03±0,15	3,68±0,15	-
Ly6G нейтрофилы	3	0,30±0,01	0,47±0,08	-
	8	0,48±0,04	5,27±0,08	<0,002
	16	0,32±0,04	4,37±0,37	<0,0004
Mac3 макрофаги	3	0,87±0,15	1,6	<0,009
	8	0,31±	4,20±0,35	<0,0004
	16	2,80±0,27	7,47±1,90	-

маркерам CD4, CD8, CD19, Ly6G, Mac3. Все пробы тщательно перемешивали и инкубировали 30 мин при 4°C, после чего дважды отмывали PBS/FCS. Во всех опытах для настройки прибора использовали пробы, в которые добавляли только одно из используемых антител, а также пробы без добавления меченых антител.

Результаты . Для оценки патологических изменений в легких, вызванных *M.avium*, мы анализировали соотношение различных клеточных популяций через 3, 8 и 16 недель после заражения. Данный эксперимент показал, что общее количество клеток у мышей B6 в несколько раз выше, чем у мышей I/St, на все сроки после заражения. Та же закономерность наблюдалась при определении количества лимфоцитов в легких мышей линий I/St и B6, но отличия выявлялись только через 3 и 8 недель после заражения (таблица).

Содержание Т-лимфоцитов $CD4^+$ в легких мышей B6 в 10 и более раз превышало этот показатель у мышей I/St через 8 недель после инфицирования (таблица). Количество Т-лимфоцитов $CD8^+$ у мышей B6 было выше через 3 и 8 недель после заражения (таблица). Количество В-клеток $CD19^+$ в легких мышей B6 в несколько раз превышало количество данных клеток у мышей I/St через 3 и 8 недель после заражения, однако эти отличия нивелировались к 16 неделе.

Как видно из данных, приведенных в таблице, инфекционный процесс, вызванный *M.avium*, сопровождается нарастанием нейтрофильного воспаления у мышей B6, о чем свидетельствует значительный прирост клеток $Ly6G^+$, начиная с 8 недели. Напротив, у мышей I/St количество нейтрофилов в легких остается на неизменном низком уровне. Ранее в нашей лаборатории было показано, что нейтрофилы обладают высокой способностью к фагоцитозу микобактерий, но при этом не способны эффективно бороться с возбудителем. Можно предположить, что в данном случае они являются резервуаром для *M.avium*. Кроме того, у чувствительных мышей линии B6 число легочных макрофагов растет на всем исследованном временном интервале (таблица, число клеток $Mac3^+$), тогда как число макрофагов у мышей I/St нарастает только к 16 неделе и остается существенно ниже, чем у чувствительных мышей (таблица).

Таким образом, при генетически детерминированной чувствительности к *M.avium*, инфекция сопровождается сильнейшей инфильтрацией ткани легких всеми основными типами лимфоидных клеток, что, вероятно, приводит к падению дыхательной функции и нарастанию легочной недостаточности, приводящей к гибели чувствительных животных.

К ВОПРОСУ О ВЛИЯНИИ ВОЗБУДИТЕЛЯ ПНЕВМОНИИ НА Т-КЛЕТОЧНУЮ ДИХОТОМИЮ

Костюшко А.В., Маркелова Е.В.

Владивостокский государственный медицинский университет, Владивосток, Россия

Активация системы цитокинов при различных вариантах воспаления происходит вне зависимости от этиологического фактора. В то же время есть данные, свидетельствующие о том, что микроорганизмы могут вырабатывать продукты, подобные цитокинам, и таким образом влиять на цитокиновый каскад при иммунном ответе. Целью данного исследования было выявить влияние этиологического фактора на показатели местного и системного профиля цитокинов (IFNγ и IL-10) при экспериментальной пневмонии, вызванной *S.aureus* и *E.coli*. Заражение мышей линии CBA проводилось интраназально в дозе $1x10^3$ м.т./мл для *S.aureus* (I опытная группа) и $1x10^5$ м.т./мл для *E.coli* (II опытная группа). Продукция цитокинов клетками крови и легких мышей исследовалась на 10 сутки после заражения в реакции ИФА с использованием реактивов «R&D system» (mouse IFNγ, mouse IL-10).В ходе проведенного исследования было выявлено, что уровень IL-10 дос-

товерно выше ($p<0,05$), чем уровень IFNγ, как у мышей контрольной группы, так и в экспериментальных группах. Так, содержание IFNγ у мышей контрольной группы составило 3,14±0,59 пг/мл в крови и 74,33±6,7 пг/мл в супернатанте легочной ткани. Системный уровень IL-10 в контрольной группе составил 15,55±0,83 пг/мл, локальный - 85,03±5,08 пг/мл. При заражении мышей *S.aureus* уровень IFNγ значительно ($p<0,05$) снижался (до 0,84±0,1 пг/мл в крови и до 36,38±2,38 пг/мл супернатанте легких). Уровень IL-10 у мышей I опытной группы также имел тенденцию к снижению и составлял 14,15±1,3 пг/мл в крови и 70,8±2,88 пг/мл в супернатанте легочной ткани. При заражении мышей *E.coli* содержание IFNγ в крови изменялось мало (3,97±0,28 пг/мл), а в супернатанте легких снижалось, но не так выраженно, как у мышей I опытной группы (70,84±2,17 пг/мл). Уровень IL-10 в крови мышей II опытной группы был достоверно ($p<0,05$) ниже, чем в группе контроля и составлял 10,8±0,87 пг/мл. А уровень IL-10 в супернатанте легочной ткани при заражении мышей *E.coli* увеличивался практически в 2 раза по сравнению с группой контроля (186,08±5,13 пг/мл, $p<0,05$). Таким образом, проведенное исследование выявило особенности локальной и системной продукции цитокинов в зависимости от этиологии экспериментальной пневмонии. Уровень IFNγ под влиянием *S.aureus* выраженно снижается. Развитие воспалительного процесса в легких, вызванное *E.coli*, оказывает значительное влияние на локальную продукцию IL-10, увеличивая его уровень более чем в 2 раза, при этом в периферической крови IL-10 достоверно снижается.

ГЕНЕТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ВРОЖДЕННОГО ИММУНИТЕТА К ТУБЕРКУЛЕЗНОЙ ИНФЕКЦИИ

Крамник И., Daly M.[1], Rojas M., Pan H., Gittieres-Pabelo J., Royaee A., Eruslanov E., Yan B.-S.

Department of Immunology and Infectious Diseases, Harvard School of Public Health, Boston, MA;

[1]Broad Institute, Cambridge MA.

Используя мышиную модель для генетического анализа устойчивости организма-хозяина к вирулентным *Micobacteria tuberculosis* (MTB), мы выявили основной генетический локус sst1 (supersusceptibility to tuberculosis), в котором аллель чувствительности вызывает не явный иммунодефицит, а весьма специфически выраженную прогрессию туберкулеза легких. Ген-кандидат внутри локуса sst1 – Ipr-1 (intracellular pathogen resistance 1) был обнаружен путем позиционного клонирования (Pan et al., Nature, 2005, 434: 767). Ген Ipr1 контролирует макрофагопосредованный механизм врожденного иммунитета к внутриклеточным патогенам *Micobacterium tuberculosis* (MTB) и *Listeria monocytogenes* (LM). Экспрессия полноразмерной копии этого гена в sst-1- чувствительных макрофагах повышала их способность к контрольной мультипликации внутриклеточных патогенов *MTB* и *LM in vitro*, предотвращала некроз и запускала апоптозную программу клеточной гибели в инфицированных клетках. Ген Ipr1 кодирует предсказанный ядерный белок, который имеет структурную гомологию с известными эукариотическими коактиваторами транскрипции. Полногеномная оценка экспрессии генома макрофагов, проведенная в sst1-конгенных и Ipr1-трансгенных макрофагах, выявила, что экспрессия уникального набора генов действительно существенно нарушалась геном Ipr1. Анализ функции белка: Ipr1 поможет, идентификации его специфического эффекта на взаимодействия макрофагов с патогенами и понять, как он проявляется в выраженной патологии легких *in vivo*.

В скрещиваниях мышей, конгенных по sst1, были картированы еще 4 дополнительных генных локуса, вносящих вклад в резистентность к туберкулезу. Мы нашли, что фенотипическая экспрессия некоторых новых локусов зависела от их генетических взаимодействий с локусом sst1. Хотя генный полиморфизм внутри локуса sst1 вызван свежей мутацией в сублинии C3HeB/FeJ мышей C3H, некоторые другие локусы резистентности к туберкулезу, вероятно, являются более ранними полиморфными вариантами. Были получены консомные мыши-носители хромосом линии B6, содержащих новые локусы на генетическом фоне C3H, и они были использованы для установления роли новых локусов в генетической резистентности организма-хозяина к системной и респираторной инфекции MTB, а также другими патогенами.

Существует человеческий гомолог гена Ipr1, ассоциированный с чувствительностью к туберкулезу в популяциях жителей Африки. Наши исследования показывают, что мышиная модель инфекции MTB полезна для выяснения патогенеза и генетического контроля такого сложного генетического признака, как чувствительность к туберкулезу.

Исследование финансировалось NAIID Национальных Институтов Здоровья и из грантов HLBI для И.Крамника.

GENETIC ANALYSIS OF HOST IMMUNITY TO EXPERIMENTAL INFECTION WITH VIRULENT MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS: IDENTIFICATION OF THE IPR1 GENE WITHIN THE SST1 LOCUS AND IMMUNOLOGICAL ANALYSIS OF ITS ROLE IN INNATE IMMUNITY TO INTRACELLULAR PATHOGENS

Kramnik I. , Daly M.[1], Rojas M., Pan H., Gittieres-Pabelo J., Royaee A., Eruslanov E., Yan B.-S.

Department of Immunology and Infectious Diseases, Harvard School of Public Health, Boston, MA;

[1] Broad Institute, Cambridge MA

Using mouse model for the genetic analysis of host resistance to virulent Mycobacterium tuberculosis (MTB), we have identified a major genetic locus sst1 (supersusceptibility to tuberculosis 1), at which the susceptible allele did not confer an overt immunodeficiency, but rather specifically affected progression of lung tuberculosis. A candidate gene within the sst1 locus, Ipr1 (intracellular pathogen resistance 1), was identified using positional cloning approach (Pan et al, Nature 2005, 434:767). The Ipr1 gene controls macrophage-mediated mechanism of innate immunity to intracellular pathogens Mycobacterium tuberculosis (MTB) and Listeria monocytogenes (LM). Expression of the full length copy of this gene in the sst1-susceptible macrophages increased their ability to control multiplication of intracellular pathogens MTB and LM *in vitro*, prevented necrosis and turned on the apoptotic program of cell death in the infected cells. The Ipr1 gene encodes a predicted nuclear protein that has structural homology with known eukaryotic transcriptional coactivators. Whole genome expression profiling of macrophages obtained from the sst1 congenic and Ipr1-transgenic macrophages revealed that, indeed, expression of a unique set of genes was significantly affected by the Ipr1. Analysis of the Ipr1 protein function will help identify its specific effect of on macrophage interactions with pathogens and understand how it is translated in dramatic lung pathology *in vivo*.

Four additional genetic loci contributing to tuberculosis resistance were mapped in crosses involving the sst1 congenic mice. We found that phenotypic expression of some of the new loci was dependent on their genetic interactions with the sst1 locus. While the genetic polymorphism within the sst1 locus is due to de novo mutation in C3HeB/FeJ substrain of C3H, some of the other tuberculosis resistance loci are likely to represent ancestral polymorphisms. Consomic mice that carry the B6-derived chromosomes containing the new loci on the C3H genetic background were generated and are being used to assess the role of the new loci in host resistance to systemic and respiratory infection with MTB as well as to other pathogens.

Human homologue of the Ipr1 gene exists and has been associated with susceptibility to tuberculosis in human populations in Africa. Our studies demonstrate that mouse model of infection with MTB is useful for dissecting pathogenesis and genetic control of such complex genetic trait as susceptibility to tuberculosis.

Funded by NIH NAIID and NIH HLBI grants to IK.

ВЛИЯНИЕ ЭКЗОГЕННОГО ТИРОКСИНА НА ФАГОЦИТАРНУЮ АКТИВНОСТЬ ЛЕЙКОЦИТОВ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ И МАКРОФАГОВ ПЕРИТОНЕАЛЬНОЙ ПОЛОСТИ В СИСТЕМЕ *IN VIVO* И *IN VITRO*

Красных М.С., Бахметьев Б.А., Ширшев С.В.

Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН, Пермь, Россия

Тиреоидные гормоны играют существенную роль в регуляции пролиферации и дифференцировки клеток иммунной системы. В немногочисленных работах, посвященных анализу влияния тиреоидных гормонов на функции фагоцитирующих клеток, выявлена не только стимуляция поглотительной активности интактных лейкоцитов периферической крови и перитонеальных макрофагов, но и ее угнетение для этих клеток. Вместе с тем, одновременная оценка влияния тироксина (T_4) на активность отдельных популяций лейкоцитов, способных к фагоцитозу в системе *in vivo* и *in vitro* до настоящего момента не проводилась, поэтому целью данного исследования явилось изучение влияния экзогенного T_4 на фагоцитарную активность лейкоцитов периферической крови и макрофагов перитонеальной полости в системе *in vivo* и *in vitro*.

Материалы и методы. Эксперименты проведены на мышах-самцах породы Swiss. Экзогенный T_4 вводили мышам подкожно в суточных дозах 0,04 мг/кг, или 40 мг/кг на протяжении 10 дней. Выбранные дозы гормона моделировали состояние экспериментального гипертиреоза. В качестве контроля использовали инъекции изотонического растворителя гормона (0,1H NaOH). Фагоцитарную активность лейкоцитов периферической крови и перитонеальных макрофагов регистрировали по поглощению формалинизированных эритроцитов барана. В системе *in vitro* исследовали влияние T_4 на фагоцитарную активность интактных клеток крови и перитонеальной полости. Для раскрытия возможных механизмов действия гормонов на фагоциты использовали ингибиторы циклооксигеназы (ЦОГ) ("Диклонак", ЛЮПИН, Индия, 0,015 мг/мл) и Ca^{2+}-каналов L-типа ("Изоптин", Knoll AG, Германия, 0,025 мг/мл) в краткосрочной культуре интактных клеток крови и перитонеальной полости. Для корректной экстраполяции результатов *in vivo* и *in vitro* использовали следующие концентрации гормонов. T_4 использовали в концентрации $8Ч10^{-10}$ М, соответствующей его повышенному содержанию в сыворотке крови гипертиреоидных животных и $8Ч10^{-12}$ М, соответствующей его нормальному уровню в сыворотке крови контрольных мышей.

Основные результаты. Инъекции T_4 в дозе 0,04 мг/кг экспериментальным животным не влияли на фагоцитарную активность макрофагов перитонеальной полости, однако повышали индивидуальную поглотительную активность нейтрофилов крови, в то время как введение высокой дозы гормона (40 мг/кг) сопровождалось оппозитными изменениями. Наблюдалось снижение количества фагоцитирующих нейтрофилов крови и общей поглотительной активности нейтрофилов и перитонеальных макрофагов. Для проверки возможности прямого действия T_4 в системе *in vitro* исследовали поглотительную активность интактных клеток крови и перитонеальной полости. В условиях инкубации лейкоцитов крови с T_4 в концентрациях $8{\cdot}10^{-10}$ и $8{\cdot}10^{-12}$ М реализовались иммуносупрессивные эффекты гормона на поглотительную активность нейтрофилов крови. Внесение ингибитора ЦОГ отменяло угнетающее действие гормона на фагоцитарную активность нейтрофилов крови. Напротив, на фоне блокады Ca^{2+}-каналов L-типа ингибирующие эффекты T_4 в концентрации $8{\cdot}10^{-10}$ М сохранялись. Таким образом, угнетающее действие T_4 на нейтрофилы крови зависит от ЦОГ, что предполагает непосредственное участие простогландинов, способных ингибировать функциональную активность данных клеток, через увеличение в клетке цАМФ. На перитонеальные макрофаги T_4 оказывал прямо противоположный эффект, повышая их поглотительную активность. На фоне блокады ЦОГ и Ca^{2+}-каналов L-типа стимулирующее действие гормона сохранялось. В целом, на уровне макрофагов модулирующие эффекты T_4 не зависели от ЦОГ и Ca^{2+}-каналов, а по-видимому, реализовались через повышение концентрации свободного Ca^{2+} в цитозоле клетки под действием T_4.

Заключение. Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о разных механизмах, определяющих чувствительность фагоцитов к T_4 в условиях культуры. Направленность действия гормона на фагоцитарную активность нейтрофилов крови в условиях целостного организма полностью совпадает с его эффектами в системе *in vitro*. Влияние T_4 на фагоцитоз перитонеальных макрофагов разнонаправленно и *in vivo* не опосредуется через изученные сигнальные пути.

ФАКТОР РОСТА СОСУДИСТОГО ЭНДОТЕЛИЯ (VEGF) КАК ПОТЕНЦИАЛЬНЫЙ ИНДУКТОР ИНВОЛЮЦИИ ТИМУСА ПРИ ОПУХОЛЕВОМ РОСТЕ

Крылов А.В.

НИИ экспериментальной медицины РАМН, Санкт-Петербург, Россия

Тимус - центральный орган иммунной системы, ответственный за созревание и дифференцировку Т-лимфоцитов. Многими исследователями показан феномен инволюции тимуса при росте опухолей человека и животных. Фактор роста сосудистого эндотелия (VEGF) является основным ангиогенным фактором, обладающим также и иммунорегуляторной активностью. Недавно впервые было показано, что при длительном введении VEGF в организм мышей развивается инволюция тимуса. Вместе с тем известно, что при росте многих опухолей сывороточные концентрации VEGF могут значительно увеличиваться, однако механизм влияния VEGF на тимоциты не изучен.

Целью настоящего исследования послужило изучение экспрессии тимоцитами мышей мРНК VEGF, основных рецепторов факторов семейства VEGF (VEGFR1, VEGFR2, VEGFR3), а также нейропилина-1 (NRP-1), являющегося корецептором VEGFR2, и антиангиогенного фактора тромбоспондина-1 (TSP-1). Экспрессию мРНК исследуемых молекул оценивали методом обратной транскрипции и последующей ПЦР со специфическими праймерами. Методом иммуноферментного анализа оценивалось изменение уровня VEGF в сыворотках крови животных. Все показатели изучали в динамике роста сингенной перевиваемой опухоли гепатомы 22А на 3, 7, 14, 21 и 28 сутки после подкожной инокуляции $2x10^5$ клеток. Работу проводили на мышах линии С3НА. На каждом сроке исследовали по 4 опытных и 4 контрольных животных.

Проведенные исследования показали, что тимоциты интактных мышей синтезируют мРНК VEGF, VEGFR2, VEGFR3, NRP-1 и TSP-1. Было выявлено достоверное усиление экспрессии мРНК VEGFR2 на 7, 21 и 28 сутки роста гепатомы. Незначительное усиление экспрессии мРНК VEGFR3 было выявлено только на 7 сутки роста опухоли. Также было показано изменение в уровнях экспрессии мРНК VEGF и TSP-1. Детектировалось снижение уровня экспрессии мРНК VEGF на 7-х и 14-х сутках исследования, когда экспрессия мРНК TSP-1 не менялась по отношению к контролю, и наоборот, достоверное усиление экспрессии мРНК TSP-1 на 21 и 28-е сутки эксперимента, когда не было обнаружено изменений в экспрессии мРНК VEGF.

Полученные **результаты** выявили отсутствие экспрессии мРНК VEGFR1 в тимоцитах как контрольных, так и опухолевых мышей. Также не было обнаружено изменений в сывороточных концентрациях VEGF у опухолевых животных по сравнению с контролем на всех сроках роста опухоли.

Изучение экспрессии в тимоцитах мышей мРНК всех перечисленных молекул и их рецепторов проводилось впервые. Нами получены новые данные по изменению уровня экспрессии мРНК VEGF, VEGFR2 и VEGFR3, а также важного компонента внеклеточного матрикса и антиангиогенного фактора TSP-1 в тимоцитах на различных сроках роста опухоли. Значительное усиление экспрессии мРНК VEGFR2 в тимоцитах на терминальных сроках исследования, по всей видимости, свидетельствует в пользу участия VEGF в механизмах инволюции тимуса при опухолевом росте. Несмотря на то, что нам не удалось обнаружить изменений в сывороточных концентрациях VEGF, можно предположить, что сам фактор синтезируется локально в тимусе и является продуктом стромальных клеток тимуса. Полученные результаты имеют важное значение для понимания механизмов взаимодействия ангиогенных факторов и клеток иммунной системы.

Работа поддержана грантами РФФИ №06-04-48250а и НШ №540.2003.4.

ПРОДУКЦИЯ АКТИВНЫХ ФОРМ КИСЛОРОДА: СРАВНИТЕЛЬНО-ИММУНОЛОГИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ

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

НИИ экспериментальной медицины РАМН, Санкт-Петербург, Россия

Ключевое место в системе защиты организма как позвоночных, так и беспозвоночных животных занимают реакции врожденного иммунитета, основанные на наличии циркулирующих фагоцитов, способных к распознаванию и элиминации внедрившегося патогена. Универсальным свойством фагоцитов является способность к генерации кислородных радикалов. В ходе работы была проведена адаптация методов спонтанного и зимозан-индуцированного теста восстановления нитросинего тетразолия (НСТ-тест) к новому объекту (морская звезда *Asterias rubens*) и продемонстрирована способность фагоцитов иглокожих к продукции активных форм кислорода. Исследование динамики продукции супероксиданиона O_2^- выявило зависимость между введением модельных антигенов (эритроцитов человека, зимозана и суспензии живых бактерий рода *Pseudomonas*, выделенных с покровов морских звезд) и уровнем продукции супероксиданиона целомоцитами морских звезд на сроках 1-120 ч после начала эксперимента. Введение антигенов приводило к усилению продукции супероксиданиона как в спонтанном, так и в зимозан-индуцированном НСТ-тестах. Данные показатели у иммунизированных животных на протяжении всего срока наблюдения превосходили результаты контрольной группы. В экспериментах *in vitro* была проведена оценка влияния как корпускулярных (зимозан, суспензия *S.aureus*), так и растворимых модельных антигенов (липополисахарид *Salmonella typhi*) на продукцию O_2^- целомоцитами морской звезды. Наибольший прирост синтеза активных форм кислорода наблюдался при внесении 0,4% суспензии зимозана, когда данный показатель превышал результаты спонтанного НСТ-теста на 148%. При внесении рекомбинантного IL-1α в культуры целомоцитов наблюдалось увеличение как спонтанной, так и зимозан-индуцированной продукции активных форм кислорода. IL-1α в концентрации 100 пг/мл приводил к 48%-му приросту синтеза O_2^- в случае спонтанного НСТ-теста и 28,5%-му – в случае стимулированного зимозаном. Примерно аналогичные результаты были получены при внесении в культуры клеток IL-1α в концентрации 25 пг/мл, когда были зарегистрированы приросты спонтанной и стимулированной продукции активных форм кислорода на 32 и 25% соответственно. Использование IL-1β, IL-8 и IFNγ в аналогичных концентрациях не приводило к изменению активности целомоцитов. Исследование влияния лектинов животного и растительного происхождения на продукцию активных форм кислорода показало, что внесение лектина арахиса (βDGal, 25 мг/мл) приводило к увеличению активности целомоцитов в 2,6 раза. Лимфоцитарный митоген, лектины пшеницы (βDGal), КонА (αDMan), виноградной улитки (NAcDGal) увеличивали синтез $\mathbf{O_2^-}$ на 130-150% по сравнению с контролем. Внесение (NAcDGal), лектинов сои (NAcDGal), бобовника (αLFuc) и гороха (αDMan) приводило лишь к незначительному приросту продукции активных форм кислорода. Работа поддержана грантом РФФИ № 04-04-49069.

ВЛИЯНИЕ СИНТЕТИЧЕСКИХ ПЕПТИДОВ ГИПОФИЗА НА ИММУНИТЕТ У ПТИЦ, ГИПОФИЗЭКТОМИРОВАННЫХ В КРИТИЧЕСКИЙ (НА 40 ДЕНЬ ЖИЗНИ) ПЕРИОД

Кузник Б.И., Патеюк А.В., Баранчугова Л.М., Чипизубова Н.С., Обыденко В.И., Лаба Е.М.

Читинская государственная медицинская академия, Чита, Россия

В предыдущих наших исследованиях установлено, что неонатальная гипофизэктомия цыплят приводит к разви-

тию выраженного иммунодефицита. Применение же пептидов, синтезированных на основе изучения аминокислотного анализа цитомединов передней (ППДГ – Lys-Clu-Asp-Gly) и задней (ПЗДГ – Ala-Glu-Asp-Gly) долей гипофиза, в значительной степени восстанавливает иммунитет у таких птиц. В дальнейшем мы решили проследить, какое влияние окажут ППДГ и ПЗДГ при гипофизэктомии, произведенной на 40 день жизни цыплят. Указанный срок операции был избран потому, что у птиц на этом этапе жизни отмечается критический период, характеризующийся снижением количества лейкоцитов в периферической крови, уменьшением титра антител и угнетением иммунитета (Болотников И.А., 1993).

Эксперименты проведены на 150 цыплятах, у 105 из них удаляли гипофиз, а 45 производили ложную операцию. 45 цыплятам после удаления гипофиза, начиная с 5 суток после операции, в течение 30 дней вводили физ. раствор, 30 – ППДГ и 30 – ПЗДГ в дозе 0,1 мг/кг массы. Показатели иммунитета исследовали на 35 сутки после операции.

Гипофизэктомированные цыплята, получавшие физ. раствор, на 35 сутки после операции отличались вялостью и плохим аппетитом, среди них был очень высок падёж (погибло 10 цыплят из 30). У таких птиц отмечались демпинг-синдром, выраженный иммунодефицит и кишечный дисбактериоз. Цыплята резко отставали в росте (в 1,5 раза), у них снижалась масса тимуса (в 1,9 раза), масса бурсы в (2,1 раза) и масса селезенки в (1,7 раза). Число клеток в селезёнке падало в 1,5 раза, количество АОК, индекс АЗКЦ и содержание лейкоцитов в периферической крови – более чем в 2 раза, а титр антител снижался в 1,8 раза. Кроме того, у данной группы птиц развивался ДВС-синдром, сопровождающийся коагулопатией потребления, которая проявлялась кишечными кровотечениями и мелкоочаговыми кровоизлияниями практически во все внутренние органы. Следует отметить, что столь выраженных сдвигов в иммунитете и гемостазе никогда не наблюдалось при гипофизэктомии, произведенной на других сроках жизни цыплят.

На 35 сутки после операции среди гипофизэктомированных цыплят, получавших ППДГ, погибло всего 2 цыпленка. Масса тела птиц в этой группе возрастала в 1,1, масса тимуса – в 1,4 раза, но эти показатели оставались значительно ниже цифр, характерных для ложнооперированных птиц. Масса бурсы к этому сроку у цыплят возрастала в 1,1 раза, а её отношение к массе тела не изменялось. Масса селезенки повышалась в 1,2 раза, а количество клеток в селезёнке увеличилось всего в 1,1 раза. После инъекций ППДГ общее число лейкоцитов, титр антител возрастали в 1,2 раза, а содержание АОК и индекс АЗКЦ – в 1,5 раза.

В группе птиц, которым вводили ПЗДГ, на 35 день погиб только 1 цыпленок. Общая масса тела в этой серии экспериментов повышалась в 1,2 раза, тогда как масса бурсы увеличилась в 1,7 раза, а её отношение к массе тела – в 1,4 раза. Масса тимуса повышалась в 1,4 раза. Число лейкоцитов у таких птиц возрастало в 1,2 раза. Масса селезенки у них, по сравнению с гипофизэктомированными птицами, получавшими физ. раствор, увеличивалась в 1,3 раза, но не достигала цифр, характерных для ложнооперированных птиц. Индекс АЗКЦ и количество АОК у таких птиц повышались в 1,6 раза, а титр антител – в 1,4 раза, хотя и оставались ниже нормы. Обращает на себя внимание, что к 35 дню после гипофизэктомии введение ПЗДГ в большей степени, чем ППДГ, увеличивало массу тела и бурсы, индекс АЗКЦ, число АОК и титр антител. Следует особо отметить, что ППДГ и ПЗДГ ликвидировали у гипофизэктомированных птиц явления ДВС-синдрома. У таких цыплят ни в одном случае не отмечалось явлений кровоточивости.

Представленные данные с несомненностью свидетельствуют о том, что у птиц на 35-40 сутки жизни возникает критический период, который сопровождается иммунологическими сдвигами, зависящими не только от функции тимуса и бурсы, но, возможно, и от изменения гормонального фона. Гипофизэктомия, произведенная в данный период жизни, еще больше усугубила иммунологические нарушения, которые привели на 40-45 день после операции практически к 100% гибели экспериментальных цыплят. Синтезированные пептиды частично нивелировали патологические нарушения в системах иммунитета и гемостаза, что сопровождалось почти полной ликвидацией падежа птиц.

ИССЛЕДОВАНИЕ ЭКСТРАТИМИЧЕСКОЙ ДИФФЕРЕНЦИРОВКИ αβT-ЛИМФОЦИТОВ ПРИ БЕРЕМЕННОСТИ

Куклина Е.М., Ширшев С.В., Паршакова Н.С.

Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН, Пермь, Россия

Основные этапы созревания и дифференцировки αβT-лимфоцитов происходят в тимусе. В период беременности тимус претерпевает временную инволюцию. Тем не менее, эффективность иммунных реакций, контролируемых αβT-клетками, при этом снижается незначительно, а в ряде случаев даже возрастает. Возможно, данный феномен связан с тем, что часть функций по поддержанию дифференцировки αβT-лимфоцитов при беременности берут на себя периферические органы иммунной системы.

Целью настоящей работы было изучение присутствия незрелых αβT-лимфоцитов и наличия процессов реаранжировки антигенного рецептора Т-клеток (TCR) в периферических лимфоидных органах мышей при беременности.

Материалы и методы. Критерием служили соответственно экспрессия в клетках мРНК нереаранжированной α-цепи TCR (пре-TCRα) и рекомбиназы RAG-1. Основной метод, использованный в работе – обратно-транскриптазная полимеразная цепная реакция.

Основные результаты. На первом этапе исследования проводились на мышах породы Swiss. Т-клетки выделяли из тимуса (положительный контроль) и лимфатических узлов, отдельно – дренирующих матку (парааортальных) и не дренирующих (паховых, мезентериальных и подмышечных). Установлено, что на ранней стадии беременности (5-е сутки) экспрессия мРНК RAG-1 и пре-TCRα выявляется только в тимоцитах, но отсутствует в периферических Т-лимфоцитах – как и у небеременных самок. На 12-е сутки зафиксирована экспрессия обоих транскриптов в Т-клетках парааортальных (дренирующих матку) лимфоузлов, а на поздних сроках беременности (18-е сутки), - наряду с парааортальными, и в не дренирующих матку лимфоузлах, главным образом, подмышечных. На втором этапе работы аналогичные исследования были проведены на самках мышей линии CBA, которых скрещивали с самцами линий BALB (нормальная аллогенная беременность), CBA (нормальная сингенная беременность) и DBA (склонная к аборту комбинация). Установлено, что в отличие от небеременных самок CBA, у которых экспрессия RAG-1 выявляется только в тимусе, у беременных мышей уже на 9-е сутки гестации мРНК RAG-1 определяется и в периферических Т-лимфоцитах – причем это характерно как

для нормальной беременности (CBA x BALB, CBA x CBA), так и для склонной к аборту комбинации (CBA x DBA). Различие между группами заключается только в том, что если при нормальной беременности (и сингенной, и аллогенной) мРНК RAG-1 выявляется, как правило, во всех исследованных лимфоузлах - парааортальных (экспрессия более устойчивая), мезентериальных и подмышечных, то у самок CBA x DBA в мезентериальных лимфоузлах она практически не определяется.

Заключение. Начиная со второй половины беременности, дифференцировка Т-лимфоцитов может осуществляться как в центральных (тимус), так и в периферических лимфоидных органах. Возможно, такая дифференцировка сопровождается коррекцией антигенраспознающего репертуара αβТ-лимфоцитов на периферии и представляет собой еще один, ранее неизвестный механизм формирования иммунной толерантности матери к генетически чужеродному (полуаллогенному) плоду.

АНТИГЕННАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ВЫСОКОКОНСЕРВАТИВНЫХ УЧАСТКОВ ОБОЛОЧЕЧНЫХ БЕЛКОВ ВИРУСА ГЕПАТИТА С

Кураева Т.Е., Соболев Б.Н., Алешина Е.Ю., Кузьмина Т.И., Колесанова Е.Ф.

ГУ НИИ Биомедицинской химии им. В.Н. Ореховича РАМН, Москва, Россия

Около 300000 пациентов инфицированы вирусом гепатита С (ВГС). В настоящее время все еще не разработаны эффективные методы диагностики и лечения ВГС. Причиной этого является высокая вариабельность оболочечных белков ВГС. Поэтому цель данной работы – изучить антигенные свойства высококонсервативных фрагментов оболочечного белка Е2 ВГС. Антитела против таких участков могут обладать вируснейтрализующей активностью, а исследуемые участки могли бы быть использованы как компоненты экспериментальных пептидных вакцин.

Материалы и методы. Были получены 8 иммуногенных конструкций, представляющих собой конъюгаты пептидов с белками носителями (бычий сывороточный альбумин (БСА) и миоглобин лошади (МГ)) или свободные пептиды. Для получения антител к перечисленным конструкциям была проведена иммунизация мышей. Полученные сыворотки были тестированы методом ИФА.

Результаты и обсуждения. Аминокислотная последовательность пептидов, входящих в состав иммуногенных конструкций, соответствует последовательностям двух (I, II,) консервативных участков оболочечного белка Е2. Высококонсервативный относительно гидрофобный фрагмент II был предсказан как один из хелперных Т-эпитопных мотивов, обладающих широкой специфичностью в отношении MHC-II. Этот фрагмент был использован в качестве Т-хелперного эпитопного мотива в составе пептидных конструкций, включающих в качестве предполагаемого В-эпитопа очень гидрофильный участок I, который является частью фрагмента белка Е2, возможно, ответственного за взаимодействие с гепарансульфатами. В одной из конструкций, состоящей из 31 а.к. остатка, фрагмент I располагается на N-конце, а в другой состоящей из 30 а.к. остатка – на С-конце молекулы. В- и Т-эпитопы в составе конструкций разделены линкерными участками, обеспечивающими возможность поворота одной части конструкции относительно другой. Данные конструкции были использованы для иммунизации как в свободном виде (с адъювантом и без), так и в виде конъюгатов с БСА.

Кроме того, 4 иммуногенные конструкции представляли собой белковые конъюгаты пептида длиной 11 а.к. остатков, включающего фрагмент I.

Для проверки антигенности полученных конструкций 10 групп мышей по 5 животных в каждой были иммунизированы этими конструкциями с использованием или без адъюванта Фрейнда.

Были получены антипептидные антитела с различным титром. Титры антител к Т-В-эпитопной конструкции на несколько порядков выше титров антител, полученных к конъюгатам, что подтверждает предполагаемую Т-хелперную активность исследуемого фрагмента.

Тестирование сывороток, содержащих антипептидные антитела на способность взаимодействовать с препаратами оболочечных белков ВГС (полноразмерного Е2 и гетеродимера Е1Е2) показало, что из 37 сывороток 10 сывороток взаимодействуют с Е2, и 9 сывороток с Е1Е2 с различной эффективностью.

Заключение. Способность полученных антипептидных антител взаимодействовать с полноразмерным белком Е2 и гетеродимером Е1Е2 указывает на то, что изученные фрагменты могут быть использованы для дальнейшей разработки кандидатной пептидной вакцины против ВГС.

Работа поддержана Федеральной программой РАМН "Живые системы. Лот 1 ЖС-КП 6/003".

ИЗМЕНЕНИЕ НАПРАВЛЕННОСТИ ВЛИЯНИЯ АДРЕНЕРГИЧЕСКИХ СОЕДИНЕНИЙ НА ФАГОЦИТАРНУЮ АКТИВНОСТЬ ЛЕЙКОЦИТОВ ПРИ ВВЕДЕНИИ ГИДРОКОРТИЗОНА В УСЛОВИЯХ ФАРМАКОЛОГИЧЕСКОЙ БЛОКАДЫ β-АДРЕНОРЕЦЕПТОРОВ

Ланин Д.В., Шилов Ю.И.

Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН, Пермь, Россия, Пермский государственный университет, Россия

Известно, что глюкокортикоидные гормоны модулируют экспрессию адренорецепторов на клетках-мишенях различных органов и оказывают пермиссивный эффект по отношению к катехоламинам. **Цель работы** - изучение влияния адреналина и агониста β-адренорецепторов тербуталина *in vitro* на функции фагоцитирующих клеток периферической крови крыс при введении гидрокортизона в условиях фармакологической блокады β-адренорецепторов.

Материалы и методы. Эксперимент выполнен на крысах-самцах популяции Wistar. Животные 1-й группы получали однократно внутрибрюшинно гидрокортизона ацетат в дозе 50 мг/кг массы тела. Животным 2-й группы вводили гидрокортизон в той же дозе на фоне блокады β-адренорецепторов (4 инъекции пропранолола по 5 мг/кг массы тела подкожно с интервалом 3 ч, 1-я инъекция - за 30 мин до введения гидрокортизона). Влияние адреналина гидрохлорида (0,1 мкг/мл), агониста β-адренорецепторов тербуталина сульфата (10^{-6} М) на фагоцитарную активность нейтрофилов периферической крови по отношению к формалинизированным эритроцитам барана оценивали *in vitro* в условиях 60-минутной преинкубации клеток крови с указанными соединениями у интактных животных, а также через 6, 24 и 48 ч от введения гидрокортизона. Также проводилось исследование влияния адреналина гидрохлорида (0,1 мкг/мл) на механизмы кислородозависимой микробицидности у экспериментальных животных в спектрофотометрическом варианте НСТ-теста (спонтанный и

стимулированный опсонизированным зимозаном варианты) в указанные выше сроки. Контролем во всех случаях служили пробы с преинкубацией без препаратов.

Основные результаты. Установлено, что у интактных животных (исходный фон) тербуталин *in vitro* вызывал снижение показателей нейтрофильного и суммарного фагоцитоза по отношению к контролю. На фоне введения гидрокортизона *in vivo* снижение показателей нейтрофильного фагоцитоза и суммарной фагоцитарной активности лейкоцитов периферической крови под действием тербуталина сульфата *in vitro* во все сроки исследования сохранялось, причем через 6 часов от начала эксперимента отмечено усиление депрессивного эффекта. Через 24 и 48 часов от момента введения гормона появлялся ингибирующий эффект тербуталина сульфата на моноцитарный фагоцитоз. Таким образом, после введения гидрокортизона повышалась чувствительность моноцитов периферической крови к ингибирующему действию агониста β-адренорецепторов. При комбинации блокады β-адренорецепторов с введением гидрокортизона полностью отменялся депрессивный эффект тербуталина на фагоцитарную активность нейтрофилов и интегральные показатели суммарного фагоцитоза. Однако депрессивный эффект агониста β-адренорецепторов на моноцитарный фагоцитоз в этих условиях сохранялся. В целом полученные результаты подтверждают зависимость выраженности ингибирующего действия агониста β-адренорецепторов *in vitro* от пермиссивного действия глюкокортикоидов *in vivo*.

Адреналин *in vitro* у интактных крыс вызывал снижение показателей нейтрофильного и суммарного фагоцитоза. На фагоцитарную активность эозинофилов интактных крыс он оказывал противоположное влияние. В условиях изолированного введения гидрокортизона усиливаются ингибирующие эффекты адреналина *in vitro* на поглотительную способность фагоцитирующих клеток. При введении гидрокортизона на фоне фармакологической блокады β-адренергических рецепторов *in vivo* наблюдается отмена угнетающего действия адреналина *in vitro* и даже стимуляция нейтрофильного и общего лейкоцитарного фагоцитоза.

Адреналин *in vitro* повышал показатели спонтанного варианта НСТ-теста с клетками периферической крови. Этот эффект адреналина отменялся под действием гидрокортизона, при введении гормона на фоне блокады β-адренергических рецепторов *in vivo* стимулирующий эффект адреналина вновь появлялся.

Заключение. В условиях введения гидрокортизона выявлены изменения чувствительности фагоцитирующих клеток к адренергическим соединениям, что может быть связано с регуляцией глюкокортикоидами функциональной экспрессии разных типов адренорецепторов.

ПРИМЕНЕНИЕ РЕКОМБИНАНТНОГО ПЕПТИДА В КАЧЕСТВЕ ПРОТИВООПУХОЛЕВОЙ ВАКЦИНЫ

Лукашина М.И., Алиев В.А., Смирнова А.В., Михайлова И.Н., Вейко В.П.[1], Барсуков Ю.А., Барышников А.Ю.

ГУ Российский онкологический научный центр им. Н.Н.Блохина РАМН, Москва, Россия;

[1]Институт генетики и селекции промышленных микроорганизмов, Москва, Россия

Наибольший интерес, в настоящее время, вызывает применение дендритных клеток для терапии злокачественных новообразований. Функциональная активность дендритных клеток у онкологических больных значительно снижена, основной причиной этого явления считается не возможность их дифференцировки в зрелые формы. Создание противоопухолевых вакцин с использованием дендритных клеток основано на их культивировании, праймировании и терминальной дифференцировке *in vitro*, что является перспективной стратегией получения зрелых, функционально-активных клеток, пригодных для создания вакцин. Для праймирования дендритных клеток используют различные источники антигенов: аутологичный опухолевый лизат, опухолевую РНК, рекомбинантные пептиды и другие.

Целью настоящего исследования было изучить влияние рекомбинантного пептида MUC-1 на созревание дендритных клеток.

Материалы и методы. Из периферической крови больных колоректальным раком выделяли мононуклеарные клетки в градиенте плотности фиколла. ДК культивировали из прекрепившихся на пластик моноцитов в присутствии GM-CSF и IL-4, для терминальной дифференцировки использовали TNF-α и PGE-2, нагрузку проводили рекомбинантным пептидом, который представляет собой 22 тандемных повтора антигена MUC-1-муцин, названный $rVNTR_{22}$ и слитым со стрептавидином пептидом $rSAV\text{-}Xa\text{-}VNTR_{22}$, в концентрациях 10, 30 и 50 мкг/мл.

Результаты. После нагрузки синтетическими пептидами и терминальной дифференцировки ДК приобретали фенотип зрелых. Экспрессия CD83 (маркер зрелых ДК) наблюдалась в 30-50% клеток, CD86 и CD54 (костимулирующая молекула и молекула адгезии соответственно) в 50 « 80% клеток, HLA-DR (молекула главного комплекса гистосовместимости II класса) в 40-80% клеток, CD14, CD3 и CD20 (маркеры моноцитов, Т-лимфоцитов и В-лимфоцитов, соответственно) в 1-3% клеток. Также определяли наличие остатков рекомбинантных пептидов на поверхности ДК после нагрузки и дифференцировки по связыванию с моноклональными антителами к VNTR (клоны $VNTR_{III\text{-}4}$ и $VNTR_{IV\text{-}6}$ предоставлены Юриным В.Л.). Наименьшее связывание отмечали при концентрации белка 10 мкг/мл (2-5% клеток). По мере увеличения концентрации белка увеличивалось количество клеток, связывающихся с антителами клонов $VNTR_{III\text{-}4}$ и $VNTR_{IV\text{-}6}$ до 15% при 30 мкг/мл $rVNTR_{22}$ и до 20% при 50 мкг/мл $rVNTR_{22}$. Связывание антител клона $VNTR_{III\text{-}4}$ с поверхностью ДК, нагруженных $rSAV\text{-}Xa\text{-}VNTR_{22}$, было не значительным от 1 до 8% при разных концентрациях пептида. Тогда как антитела клона $VNTR_{IV\text{-}6}$ связывались с поверхностью ДК, нагруженных $rSAV\text{-}Xa\text{-}VNTR_{22}$, в 10-20% случаев не зависимо от концентрации белка при нагрузке.

Заключение. Таким образом, данные пептиды не влияют на созревание и дифференцировку ДК и могут быть использованы для создания противоопухолевых вакцин.

РЕГУЛЯЦИЯ ГОМЕОСТАЗА ЖЕЛЕЗА И АНЕМИЯ ВОСПАЛЕНИЯ

Лукина Е.А.

Гематологический Научный Центр РАМН, Москва, Россия

Железо – необходимый биохимический компонент важнейших процессов метаболизма, с одной стороны, и – потенциально токсичный элемент, способный вызывать окислительные повреждения биологических мембран,

белков и нуклеиновых кислот, с другой. В соответствии с этим, гомеостаз железа в организме человека жестко регулируется. В последние годы патофизиологическая роль железа пристально изучается в гематологии, гастроэнтерологии, иммунологии и нейробиологии. В лекции планируется представить новые данные, касающиеся механизмов регуляции метаболизма железа, роли печени и иммунной системы в поддержании гомеостаза этого микроэлемента, возможных клинических перспективах применения хелаторов железа.

РОЛЬ ЭНДОТЕЛИАЛЬНОГО БАРЬЕРА В ПАТОГЕНЕЗЕ PEMPHIGUS VULGARIS

Лысенко А.А.[1], Коцарева О.Д.[1], Матушевская Е.В.[2], Свирщеская Е.В.[1]

[1]Институт Биоорганической Химии им. М.М. Шемякина и Ю.В. Овчинникова РАН, Москва, Россия;

[2]Российский Государственный Медицинский Университет, Москва, Россия

Pemphigus vulgaris (PV) - аутоиммунное заболевание, проявляющееся в характерных нарушениях целости эпителиальных покровов кожи и слизистых. Ключевую роль в патогенезе заболевания играют аутоантитела IgG класса к белку межклеточной адгезии десмоглеину 3 (Дсг 3). Иммунизация мышей Дсг 3 не приводит к развитию какой-либо патологии, в то время как у неонатальных мышей при введении патогенных аутоантител развивается акантолиз. Мы предположили, что у взрослых мышей аутоантитела отделены от эпидермиса эндотелиальным барьером. В данном исследовании нами проверена гипотеза о влиянии активированных клеток эндотелия на возникновение акантолиза в эпидермисе кожи мышей, иммунизированных Дсг 3. Рекомбинантный белок Д1-2, соответствующий двум дистальным экстраклеточным доменам десмоглеина 3 человека, был экспрессирован в *E.coli*. Мыши линий BALB/c, CBA и C57BL/6 были пятикратно проиммунизированы Д1-2 в полном адъюванте Фрейнда. В результате иммунизации были получены высокие титры антител IgG1 класса против белка Д1-2. Однако наличие такого пула анти-Д1-2 антител в крови не инициировало развитие патологии эпидермиса, что было показано с помощью гистологических исследований образцов кожи мышей. Для активирования клеток эндотелия, иммунизированным мышам подкожно была проведена однократная инъекция убитых нагреванием бактерий *Micrococcus lysodeikticus (ML)*. Инъекция бактерий привела к развитию акантолиза в течение 2 дней у мышей всех трех линий. Для проверки полученных результатов IgG антитела из сыворотки больных PV или сыворотки кролика, проиммунизированного белком Д1-2 были введены другому кролику. Также была сделана однократная подкожная инъекция бактерий ML. В результате, возникновение акантолиза и появление эрозий наблюдалось только при сочетании двух факторов - наличия пула антител к десмоглеину 3 и инъекции бактерий.

Таким образом, нами сделаны следующие выводы: 1) высокий титр аутоантител недостаточен для инициирования заболевания при условии наличия неактивированных клеток эндотелия; 2) активация клеток эндотелия необходима для образования акантолиза при патогенезе *Pemphigus vulgaris*.

ДИФФЕРЕНЦИРОВКА, МИГРАЦИЯ И РЕГУЛЯЦИЯ АКТИВНОСТИ ЭФФЕКТОРНЫХ ЛИМФОЦИТОВ CD4, ПРОДУЦИРУЮЩИХ ИНТЕРФЕРОН-ГАММА

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

Центральный НИИ туберкулеза РАМН, Москва, Россия

При различных инфекциях протективный иммунный ответ зависит от успешной дифференцировки и миграции в очаг воспаления эффекторных Т лимфоцитов. С другой стороны, чрезмерное накопление лимфоцитов и их гиперреактивность могут приводить к патологическим последствиям и серьезной деструкции ткани в очаге инфекции. В целом, течение и исход инфекции зависят от сбалансированности образования, миграции в периферические ткани, функциональной активности и последующей гибели эффекторных лимфоцитов. В докладе на модели экспериментальной туберкулезной инфекции рассматриваются вопросы дифференцировки, миграции и регуляции активности эффекторных лимфоцитов CD4 в лимфоидных органах и легочной ткани.

Нами показано, что эффекторные лимфоциты CD4, экспрессирующие фенотип $CD44^{hi}CD62L^{lo}$, состоят из двух основных субпопуляций клеток: $CD27^{hi}$ и $CD27^{lo}$. Лимфоциты $CD62L^{lo}CD27^{lo}$ представляют собой дифференцированные лимфоциты Th1, обладающие высокой способностью к продукции IFN-γ и характеризующиеся высокой чувствительностью к апоптозу (результаты анализа экспрессии генов методом микроэррей, ПЦР в реальном времени, данные определения внутриклеточного содержания цитокинов и ELISPOT).

Лимфоциты $CD62L^{lo}CD27^{lo}$ образуются из клеток-предшественников, имеющих фенотип $CD62L^{lo}CD27^{hi}$. Соотношение субпопуляций эффекторных лимфоцитов $CD62L^{lo}CD27^{hi}$ и $CD62L^{lo}CD27^{lo}$ различно в разных органах. В лимфатических узлах, в том числе и в лимфатических узлах, инфицированных микобактериями, основную часть эффекторных клеток составляют лимфоциты $CD27^{hi}$. В легких, напротив, преобладает субпопуляция лимфоцитов $CD27^{lo}$. Способностью к миграции в легочную ткань обладают обе субпопуляции лимфоцитов. Нами впервые показано, что в легочной ткани происходит дифференцировка лимфоцитов $CD62L^{lo}CD27^{hi}$ с образованием высокодифференцированных эффекторов $CD62L^{lo}CD27^{lo}$, продуцирующих IFN-γ. Таким образом, преимущественное накопление эффекторов $CD62L^{lo}CD27^{lo}$ в легочной ткани обусловлено их образованием *in situ*.

В генетически гетерогенной популяции эффективность дифференцировки $CD27^{hi} \rightarrow CD27^{lo}$ в легких различна у отдельных животных. Чтобы оценить значение данного этапа дифференцировки Т-лимфоцитов для протекции против туберкулезной инфекции, мы получили, инфицировали *M. tuberculosis* и проанализировали 109 мышей-гибридов (I/St x A/Sn)F2. Гибриды были получены путем скрещивания мышей линии I/St (мыши, генетически чувствительные к туберкулезной инфекции) и A/Sn (генетически резистентные мыши). В легких инфицированных мышей F2 соотношение клеток $CD27^{lo}/CD27^{hi}$ варьировало в пределах от 0,88 до 12,7. При этом более высокое содержание клеток $CD27^{lo}$ и более высокий индекс $CD27^{lo}/CD27^{hi}$ наблюдались у мышей с более мягким течением инфекции ($p=0,0012$), свидетельствуя о протективной роли высокодифференцированных лимфоцитов $CD4^{+}CD27^{lo}$ при острой туберкулезной инфекции.

Исследования субпопуляции эффекторных лимфоцитов, имеющих фенотип $CD62L^{lo}CD27^{hi}$, показали, что эта популяция клеток гетерогенна и включает в себя предшественники лимфоцитов $CD27^{lo}$, а также лимфоциты Th2 и регуляторные ($CD25^{hi}$ $FoxP3^{+}$) Т-клетки. По нашим данным, регуляторные лимфоциты $CD27^{hi}CD25^{hi}$ могут подавлять дифференцировку $CD27^{hi} \rightarrow CD27^{lo}$, происходящую в легочной ткани.

Таким образом, уровень экспрессии молекул CD27 позволяет выделить две субпопуляции эффекторных лимфоцитов CD4. Популяция $CD27^{lo}$ образована высокодифференцированными лимфоцитами Th1, которые образуются из клеток-предшественников непосредственно в легочной ткани и характеризуются высокой способностью к продукции IFN-γ и чувствительностью к апоптозу. Популяция лимфоцитов $CD27^{hi}$ представляет собой совокупность более длительно живущих лимфоцитов CD4, обладающих различной функциональной активностью и локализующихся преимущественно в лимфоидных органах. Эта популяция клеток может иметь значение для ограничения воспалительных реакций, в частности, при хронических инфекциях.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ КОРЕВЫЕ ВАКЦИНЫ КАК СРЕДСТВО ИММУНОЛОГИЧЕСКОГО ИССЛЕДОВАНИЯ ВАКЦИНАЛЬНОГО ПРОЦЕССА

Ляшенко В.А.

ГУ НИИ вирусных препаратов имени О.Г.Анджапаридзе РАМН, Москва, Россия

В настоящее время ряд детских вирусных инфекций, включая корь, подлежат ликвидации посредством вакцинации. Некоторым странам удалось практически избавиться от кори, но это избавление не выглядит окончательным, так как прививочный иммунитет имеет ограниченную продолжительность, и случаи «завозной» кори не исключены. Повсеместно применяемая живая коревая вакцина (ЖКВ) обладает остаточной патогенностью для иммунокомпрометированных лиц и аллергогенна для лиц, сенсибилизированных к птичьему белку, поэтому поиски новых вакцин для массовых ревакцинаций вполне оправданы. В эксперименте разработка новых коревых вакцин была весьма продуктивна, так как важнейшие антигены коревого вируса (гемагглютинин и fusion белок) изучены на молекулярном уровне. Кроме дорогостоящей модели коревой инфекции на обезьянах, освоена модель коревой пневмонии на хлопковых крысах.

К настоящему времени предложены три основные разновидности новых коревых вакцин: рекомбинантные, ДНК-вакцины и модифицированные ЖКВ.

Работа с рекомбинантными и ДНК-вакцинами показала, во-первых, что защита от инфекции может быть обусловлена иммунным ответом (антитела и CTL) против одного или обоих выше упомянутых антигенов, присутствие в составе вакцин остальных не обязательно. Существенным является тот факт, что присутствие установленной мишени для вируса коревой вакцины – рецептора CD46 – не обязательно для развития иммунного ответа. Напротив, контакт макрофагов мыши, трансфецированной CD46, с вирусом приводит к выделению ряда веществ, способных тормозить иммуногенез.

Использование различных вариантов вакцины показывает, что динамика накопления вирусных антигенов в организме не играет решающей роли и, следовательно, исходная ЖКВ не обладает решающим преимуществом в этом отношении. Работа с ДНК-вакцинами позволила исследовать молекулярные модификации вышеупомянутых антигенов, предлагаемые с целью усиления образования CTL, а также – с целью «ухода» от нейтрализующей активности материнских антител в организме детей 6-месячного возраста.

Наиболее исследованной модификацией исходной ЖКВ было изготовление препаратов для нанесения вакцины на слизистую оболочку (аэрозольное или интраназальное введение препаратов). Мукозная вакцинация человека, согласно ряду исследований, столь же эффективна, как подкожная, но значительно менее реактогенна. Согласно нашим данным, интраназально вводимая ЖКВ безопаснее в смысле проявлений побочного иммунотропного действия ЖКВ, которое заключается во временном подавлении способности Т-лимфоцитов ребёнка или взрослого отвечать на активацию митогенами и некоторыми антигенами. Возможность суммирования транзиторного иммунодепрессивного действия ЖКВ с действием других неблагоприятных факторов в организме иммунокомпрометированных реципиентов вполне реальна. Экспериментально было показано, что коревая иммунодепрессия обусловлена гемагглютинином вируса. Данный неблагоприятный эффект ЖКВ удалось частично нейтрализовать синтетическим миелопептидом МП-2 – вначале в системе *in vitro*, а затем в экспериментах на морских свинках, вакцинированных ЖКВ или дивакциной «корь-паротит». Показательным явилось заметное повышение иммунизирующей способности живой вакцины против эпидемического паротита, присутствующей в дивакцине. По-видимому, действие её обычно бывает сильно заторможено присутствием ЖКВ и «растормаживается» с помощью МП-2. Таким образом, в эксперименте была создана новая модификация вакцины, основанная на нейтрализации её иммунодепрессивного действия при полном сохранении (и даже усилении) иммунизирующего.

ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ ЛАБИЛЬНОСТЬ НЕЙТРОФИЛОВ НОВОРОЖДЕННЫХ ВО ВЗАИМОДЕЙСТВИИ С ХЕМОТАКСИЧЕСКИМИ ФАКТОРАМИ

Мальцева В.Н.[1], Матвеева Н.К.[2], Сафронова В.Г.[1], Сухих Г.Т.[2]

[1]Институт биофизики клетки РАН, Пущино, Россия;

[2] ГУ Научный центр акушерства, гинекологии и перинатологии РАМН, Москва, Россия

Введение. Известно, что во взрослом организме нейтрофилы вовлечены в реакции врожденной иммунной системы и установление адаптивного иммунитета. Стратегия нейтрофила в обеспечении своей основной функции – защиты от бактериальной и вирусной инфекции – состоит в том, чтобы обеспечить максимальную активность в уничтожении патогена и оградить от повреждения ткани организма-хозяина. Основу функциональной пластичности нейтрофилов составляет многообразие типов рецепторов на мембране. Механизмы иммунной реактивности новорожденных остаются невыясненными. Новорожденные считаются относительно иммунодефицитными, известные механизмы регуляции иммунных реакций направлены на сдерживание избыточного и формирование адекватного ответа. Что же характеризует нейтрофилы новорожденных - незрелость или целесообразная лабильность функцио-

нирования? Другой вопрос состоит в том, какие молекулярные события и внутриклеточные взаимодействия обеспечивают адекватное реагирование нейтрофилов новорожденных.

Задача работы состояла в том, чтобы с использованием методологии и баз данных киномики и протеомики сравнить представительство рецепторов хемотаксического пептида *N*-формил-Met-Leu-Phe (fMLF) в активации NADPH оксидазы нейтрофилов взрослого человека и новорожденных детей и оценить особенности трансдукции сигнала.

Материалы и методы. Работа проведена на клетках периферической крови здоровых взрослых добровольцев и пуповинной крови здоровых детей от матерей с физиологическим течением беременности. Функциональная активность клеток была оценена по интенсивности генерации АФК с использованием хемилюминесцентного анализа. Роль рецепторов fMLF с разным сродством и сигнальных компонентов определялась по результатам ингибиторного анализа.

Основные результаты. Клетки нефракционированной пуповинной крови, в покое и при активации опсонизированным зимозаном, продуцировали АФК значительно интенсивнее клеток периферической крови взрослых. Спонтанная продукция АФК изолированными нейтрофилами, в основном определяющими уровень генерации АФК в цельной крови человека, также была выше в случае пуповинной крови. Тогда как интенсивность респираторного взрыва в обоих случаях зависела от концентрации хемотаксического пептида. Пороговая концентрация fMLF для клеток пуповинной крови составляла около 0,001 мкМ, при концентрациях более 0,05 мкМ наблюдалось насыщение. Зависимость амплитуды респираторного взрыва гранулоцитов, изолированных из пуповинной крови, от концентрации fMLF наблюдалась в узком диапазоне (0,001-0,05 мкМ), в области концентраций 0,05-50 мкМ данный параметр практически не зависел от концентрации fMLF. Концентрационная зависимость для клеток взрослых представлена кривой с насыщением в области 10-50 мкМ fMLF. Полумаксимальная доза fMLF, необходимая для активации NADPH оксидазы, была ниже более чем на порядок для нейтрофилов новорожденных. Используя *N*-трбутоксикарбонил-Met-Leu-Phe (t-boc-MLF), антагонист рецепторов fMLF с высоким сродством, мы охарактеризовали участие высоко- и низкоаффинных рецепторов fMLF в активации NADPH оксидазы. Их представительство зависело от концентрации fMLF и имело различие в исследуемых клетках. Так, T-boc-MLF ингибировал ответ, вызванный 1 мкМ fMLF, на 50% в клетках новорожденных, и практически не влиял на респираторный взрыв в клетках взрослых, т.е. у новорожденных передача сигнала на NADPH оксидазу идет с участием высоко- и низкоаффинных рецепторов, у взрослых – преимущественно низкоаффинных. Ингибиторный анализ сигнальных путей рецептора fMLF, участвующих в регуляции активности NADPH оксидазы, показал, что ансамбль сигнальных компонентов и характер регуляции зависят от концентрации fMLF и различаются в клетках новорожденных и взрослых.

Заключение. Функциональная лабильность нейтрофилов новорожденных формируется вовлечением регуляции активности NADPH оксидазы через рецепторы с высоким сродством в широком диапазоне концентраций хемотаксических факторов. Иммунные клетки новорожденных имеют специфические механизмы, обеспечивающие быстрое реагирование, сдерживание избыточной агрессии и формирование адекватного ответа.

ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ АКТИВНОСТЬ ПЕРИТОНЕАЛЬНЫХ МАКРОФАГОВ И ГИБЕЛЬ ИММУНОКОМПЕТЕНТНЫХ КЛЕТОК ПРИ ИНДУЦИРОВАННОМ КОНКАНАВАЛИНОМ А ГЕПАТИТЕ У МЫШЕЙ

Мартынова Т.В., Алексеева И.Н., Алексюк Л.И., Брызгина Т.М., Макогон Н.В., Павлович С.И., Сухина В.С., Грушка Н.Г.

Институт физиологии им.А.А.Богомольца НАН Украины, Киев

Конканавалин А (КонА) - индуцированный гепатит у мышей является моделью аутоиммунных поражений печени, опосредованных Т-клеточным звеном иммунной реакции, активация которого приводит к индукции апоптоза гепатоцитов. Однако характерным для этого поражения является цитолитический синдром, что не должно было бы происходить при завершенном апоптозе и эффективной элиминации клеточных остатков.

Целью данной работы было изучить функциональное состояние клеток моноцитарно-макрофагальной системы организма, а также пути гибели (некроз, апоптоз) клеток печени и клеток иммунной системы при КонА-индуцированном гепатите. Исследования проведены на мышах линии СВА. КонА в дозе 30 мг/кг вводили внутривенно, через 20 ч исследовали активность трансаминаз в крови, морфологию печени, фагоцитоз частиц латекса перитонеальными макрофагами и кислород-зависимые антиинфекционные системы фагоцитоза (НСТ-тест). Спонтанную и индуцированную этопозидом и дексаметазоном гибель клеток тимуса и регионарных лимфоузлов исследовали после их 18-часового культивирования методом двойного прижизненного окрашивания красителями Хехст 33342 и пропидиум йодид. Показано, что введение КонА приводит к повреждению печени с цитолитическим компонентом (по данным повышения активности трансаминаз в сыворотке крови и гистологического изучения печени) и развитием воспаления (повышение % палочкоядерных и сегментоядерных нейтрофилов в крови, выраженные сосудистые реакции в печени с моноцитарной и нейтрофильной инфильтрацией). Вместе с тем в гепатоцитах выявлены морфологические черты, характерные для апоптоза (конденсированный хроматин, фрагментация ядер и апоптотические тельца). Применение КонА приводило к нарушению функциональной активности перитонеальных макрофагов – уменьшению фагоцитоза частиц латекса в 1,3 раза ($P<0,01$) и снижению спонтанного и индуцированного форбол-миристат-ацетатом кислородзависимого метаболизма в 1,6 ($P<0,01$) и 1,5 раза соответственно. Снижалась масса и клеточность тимуса и лимфоузлов, а также увеличивался апоптоз их клеток в культуре, индуцированный этопозидом и дексаметазоном. Обращало на себя внимание увеличение количества клеток с апоптотическими изменениями ядер и нарушенной целостью плазматической мембраны, что характерно для вторичного постапоптотического некроза (в культуре клеток лимфоузлов, обработанных дексаметазоном, в 1,3 раза, тимуса – в 1,2 раза, $P<0,05$).

Наши данные свидетельствуют, что нарушение целостности плазмалеммы клеток до завершения апоптоза и сниженная элиминация клеточных остатков при уменьшении фагоцитарной активности макрофагов могут быть причинами развития воспалительной реакции организма при аутоиммунном гепатите Т-клеточного генеза.

МЕТАЛЛОПОРФИРИНОВЫЕ КОНЪЮГАТЫ МОНОКЛОНАЛЬНЫХ АНТИТЕЛ С УВЕЛИЧЕННОЙ ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ АКТИВНОСТЬЮ

Мельникова Я.И.

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

Перспективы использования металлопорфириновых конъюгатов антител обусловлены не только высокой чувствительностью иммуноанализа с применением фосфоресцентных меченых агентов, но и их уникальными фотохимическими свойствами, позволяющими использовать подобные конъюгаты в качестве направленных фототоксинов или фоторадиотоксинов при введении радиоизотопных вариантов металлопорфиринов, что делает эти реагенты важными для целей радиоиммунолокализации и радиотерапии опухолей. Ранее предложенные методы получения подобных конъюгатов требовали двухстадийной реакции конъюгирования с активацией порфиринов на первой стадии и сопровождались значительным снижением функциональной активности антител. **Целью** данной работы было получить металлопорфириновые конъюгаты антител с неизмененной функциональной активностью в одностадийной реакции конъюгирования.

Материалы и методы. Моноклональные антитела F11 (субкласс IgG2a) к ферритину селезенки человека, их конъюгаты с биотином и ферритин получены и охарактеризованы как описано ранее [Мельникова Я.И., Лунев В.Е., Прейгерзон В.А., Лунева Н.М., Кошкин С.А., Родионов М.А., Марцев С.П. (1993) Биохимия, 58, 759-771]. Модификацию антител проводили инкубацией с активированным тетра-N-оксисукцинимидным эфиром Pd(II)-копропорфирина I, который добавляли к антителам в растворе диметилформамида при концентрации модификатора 2,2 мМ; соотношения модификатор/белок варьировали от 5:1 до 100:1. Время инкубации - 1 ч при комнатной температуре. Реакцию останавливали добавлением 0,5 М раствора глицина в 0,1 М борате Na, pH 8,5. Конъюгаты очищали гель-хроматографией с использованием Sephacryl S-200. Антигенсвязывающую активность конъюгатов и нативных антител сравнивали в конкурентном иммуноферментном анализе и определяя константы взаимодействия с помощью модифицированного нами метода Хогга и соавт. [Hogg, F.J., and Winzor, D.J. (1987) Molecular Immunology, 24, 797-801].

Основные результаты. Был обнаружен эффект достоверного увеличения антигенсвязывающей способности антитела F11 после конъюгирования с N-оксисукцинимидным эфиром Pd(II)-копропорфирина I в 3,5-7 раз в зависимости от глубины модификации. Эти данные были подтверждены в экспериментах по определению констант взаимодействия порфирин-модифицированных и нативных антител с иммобилизованным и растворимым ферритином. Конъюгаты антител с Pd(II)-копропорфирином обладали константами связывания антигена в 3-7-раз превосходящими значения констант связывания исходных антител. Отмечена двухфазная зависимость активности конъюгатов антитела F11 от глубины модификации с максимумом активации при модификации одной аминогруппы. Превышение оптимальной глубины модификации не показало обычных эффектов снижения антигенсвязывающей активности, которая была выше активности исходных антител в 3,5-5 раз.

Заключение. Получены конъюгаты N-оксисукцинимидного эфира Pd(II)копропорфирина I с ферритин-специфичными моноклональными антителами субкласса IgG2a, в одностадийной реакции конъюгирования, с антигенсвязывающей активностью, увеличенной в 3-7 раз. Двухфазная зависимость функциональной активности конъюгатов от глубины модификации свидетельствует о наличии двух популяций модифицируемых аминогрупп. Модификация более доступных из них приводит к функциональной активации молекулы IgG, модификация второй популяции аминогрупп вызывает некоторое снижение активирующего эффекта. Возможно, что причиной возрастания конформационной подвижности конъюгатов антител является и существенный зарядовый сдвиг (минус 5 единиц заряда на одну модифицированную аминогруппу), кроме того нельзя исключать возможное влияние введенного в среду инкубации органического растворителя диметилформамида.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ И ТЕОРЕТИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ ИДИОТИП-АНТИИДИОТИПИЧЕСКИХ ВЗАИМОДЕЙСТВИЙ В МЕХАНИЗМАХ РАЗВИТИЯ АУТОИММУННЫХ РЕАКЦИЙ

Меньшиков И.В., Бедулева Л.В., Иванов В.В.

Удмуртский государственный университет, Ижевск, Россия

Введение. Механизмы толерантности к антигенам собственного организма и ее срыва, ведущие к формированию аутоиммунных заболеваний остаются до конца не ясными. Одной из причин аутоиммунных заболеваний являются инфекции. Ассоциация между инфекцией и аутоиммунными заболеваниями в настоящее время объясняется антигенной мимикрией. В то же время есть данные, что центральное место в механизмах регуляции аутоклонов, провокации и ремиссии аутоиммунных заболеваний занимают идиотип-антиидиотипические взаимодействия. Развитие аутоиммунной реакции по механизму, опосредованному идиотип-антиидиотипическими взаимодействиями, должно иметь кинетическую картину, отличную от кинетики аутоиммунной реакции, развивающейся по механизму иммунного перекреста.

Задачи работы: изучение кинетики аутоантител к эритроцитам и антител на эритроциты крыс в ходе экспериментально вызванной аутоиммунной гемолитической анемии у мышей, и выяснение являются ли аутоантитела антиидиотипическими по отношению к идиотипам антител на эритроциты крыс; моделирование кинетики аутоиммунной реакции на математической модели идиотип-антиидиотипических взаимодействий.

Материалы и методы. Нелинейных мышей иммунизировали эритроцитами крыс, трижды с интервалом один день, внутрибрюшинно в дозе 2,8 $*10^8$ клеток. Кровь забирали через каждые 5 дней. Подсчитывали количество эритроцитов. Антитела к эритроцитам крыс определяли методом прямой гемагглютинации. Аутоантитела к эритроцитам определяли в реакции непрямой гемагглютинации. Способность аутоантител и антител к крысиным эритроцитам взаимодействовать друг с другом определяли в реакции торможения гемагглютинации.

Результаты. Анализ полученных данных показал, что на введение крысиных эритроцитов у мышей развивалась аутоиммунная реакция на собственные эритроциты, что проявлялось в снижении количества эритроцитов и росте аутоантител к ним. Развитие анемии коррелировало с уровнем аутоантител и предшествовало появлению антикрысиных антител. Выявлено, что максимумы образования антикрысиных и антимышиных антител не совпадают во времени. Все это позволяет предполагать, что аутоиммунная гемолитическая анемия у мышей развивается не в результате образования перекрестно-реагирующих антител на "сходные" антигенные детерминанты эритроцитов крыс и мышей, вследствие непосредственной активации гетерологичным антигеном аутоклонов, а является результатом того, что на мышиные и крысиные эритроциты реагируют разные клоны лимфоцитов. Антисыворотка, полученная на максимуме образования аутоантител, существенно подавляла реакцию агглютинации эритроцитов крыс антисывороткой, полученной на максимуме образования антител к эритроцитам крыс, что служит доказательством, что исследуемые антитела составляют пару идиотип-антиидиотип. Неожиданным оказался факт появления аутоантител на эритроциты и анемии раньше, чем началось образование антител на эритроциты крыс, в отличие от ожидаемого появления аутоантител вслед за антителами против эритроцитов крыс. Анализ нашей математической модели (Меньшиков И. и др., 2004) по результатам эксперимента показал соответствие кинетики аутоиммунной реакции, полученной в математической модели идиотип-антиидиотипических взаимодействий, экспериментальным данным. Таким образом, механизмом инициации и развития аутоиммунной гемолитической анемии у мышей является нарушение равновесия в идиотип-антиидиотипических взаимодействиях между идиотипом к чужому и антиидиотипом аутореактивного клона.

ВЛИЯНИЕ НЕЙТРОФИЛОКИНОВ НА СПОНТАННУЮ И ИНДУЦИРОВАННУЮ ХЕМИЛЮМИНЕСЦЕНЦИЮ МАКРОФАГОВ МЫШЕЙ В ХОДЕ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО ШОКА, ИНДУЦИРОВАННОГО ЛПС *YERSINIA PESTIS*

Мишанькин М.Б., Васильева Г.И., Киселева А.К., Иванова И.А., Беспалова И.А., Дорошенко Е.П.

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

Введение. В настоящее время очевидно, что в патогенезе септических состояний, вызванных ЛПС грамотрицательных бактерий, участвуют активные формы кислорода (АФК) (Salvemini D. et al., 2003; Bhattacharyya J. et al., 2004). Применение некоторых фармакологических препаратов, угнетающих образование АФК при экспериментальной терапии септических состояний, также косвенно свидетельствует об участии свободных радикалов в патогенезе эндотоксемий, сепсиса и септического шока (Liaw W.J. et al., 2005).

Цель настоящего исследования — оценить при помощи метода хемилюминесценции (ХЛ) интенсивность «оксидативного стресса» макрофагов (Мф), индуцированного ЛПС *Yersinia pestis* EV, а также возможного терапевтического влияния на этот процесс естественного комплекса нейтрофилокинов (ЕКНК) и глюкокортикоидов (ГК).

Материалы и методы. Исследования выполняли на перитонеальных Мф и нейтрофилах (НФ) беспородных мышей. В качестве индуктора синтеза ЕКНК использовали м.к. *Y. pestis* EV в дозе 10 м.к. на Нф, в качестве контроля - 0,15 М раствор NaCl. Длительность инкубирования Нф с указанными препаратами составляла 4 ч. Супернатанты, содержащие ЕКНК, получали центрифугированием культур клеток при 1000 g в течение 10 мин с последующим фильтрованием через мембранные фильтры с диаметром пор 0,22 мкм**.** Уровень цитокинов определяли методом твердофазного иммуноферментного анализа с помощью моноклональных антител к различным цитокинам (Pharmingen, USA; Caltag, Canada) (Котов,1990). Эндотоксический шок у мышей вызывали введением 2 LD50 ЛПС Y. pestis, полученного методом вводно-фенольной экстракции. ХЛ анализ проводили на люминометре LKB-1251 в непрерывном режиме измерения при 37°С. Для этого в измерительную кювету люминометра вносили 0,7 мл раствора Хенкса (pH 7,4), добавляли 0,1 раствора люминола (Serva) в концентрации 0,1 мМ и определяли уровень фонового свечения. Затем добавляли 0,1 мл клеточной суспензии МФ и через 5 мин регистрировали уровень спонтанной ХЛ клеток. Для определения уровня ХЛ МФ после воздействия индукторов в пробы добавляли 0,1 мл взвеси частиц латекса (Serva) 20 мг/мл и/или 0,1 мл ЕКНК в концентрации 10 мг/мл. Для повышения достоверности оценки результатов каждое измерение проводили в 3 повторностях.

Основные результаты. Анализируя результаты наших экспериментов, необходимо отметить общую тенденцию для исходной ХЛ клеток, полученных от всех групп исследованных животных. Наибольшее свечение было зарегистрировано у интактных клеток. При этом одинаковый уровень ХЛ отмечался у Мф, полученных от животных, обработанных, как ЕКНК, так и ГК. Клетки, полученные от животных, обработанных ЛПС и получавших ГК в терапевтических концентрациях, продуцировали АФК практически на том же уровне, что и контрольные, получавшие только ЕКНК или ГК. Интересно, что уровень ХЛ клеток, полученных от мышей в агональной стадии эндотоксического шока, мало отличался от фоновых показателей. Добавление в систему взвеси латексных частиц через 5 мин наблюдения вызвало усиление ХЛ макрофагов только у контрольных интактных животных. Клетки других исследованных групп не реагировали каким-либо значимым усилением образования АФК. Достоверность различий уровней ХЛ клеток постепенно снижалась. Примерно через 1,5 ч наблюдения свечение снизилось до фонового уровня. Обращает на себя внимание тот факт, что клетки, полученные от всех групп животных, при сохранении общей тенденции в степени исходного свечения одинаково отреагировали на введение в систему ЕКНК. Впоследствии, при добавлении инертных частиц латекса в кюветы на 30 мин эксперимента, нам не удалось зарегистрировать какое-либо изменение уровней ХЛ макрофагов, что свидетельствует о крайне низком функциональном запасе дыхательных цепей и процессов окислительного фосфорилирования исследуемых клеток. Это, по-видимому, можно объяснить терминальной фазой процессов эндотоксического шока или же специфическим воздействием ЕКНК.

Заключение. Результаты наших исследований свидетельствуют о том, что ЕКНК, синтезируемый Нф, способствует выживанию экспериментальных животных и снижает интенсивность «оксидативного стресса» Мф, индуцированного ЛПС *Y. pestis EV*.

ВЛИЯНИЕ БЕЛКА ТЕПЛОВОГО ШОКА HSP70 *M. TUBERCULOSIS* НА СПОСОБНОСТЬ ДЕНДРИТНЫХ КЛЕТОК ЧЕЛОВЕКА АКТИВИРОВАТЬ ПРОДУКЦИЮ ИНТЕРФЕРОНА-ГАММА И ЦИТОТОКСИЧЕСКУЮ АКТИВНОСТЬ ЛИМФОЦИТОВ

Москалева Е.Ю.[1], Хомякова А.В.[2, 3], Гукасова Н.В.[1], Корженевский Д.А.[3], Позднякова Л.П.[3], Свешников П.Г.[3], Северин С.Е.[1, 2], Северин Е.С.[2, 3]

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

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

[3]Всероссийский научный центр молекулярной диагностики и лечения, Москва, Россия

Дендритные клетки (ДК), макрофаги, нейтрофилы, эозинофилы и NK-клетки относятся к тем клеткам системы естественного иммунитета, которые обеспечивают первую линию неспецифической защиты организма человека от патогенов. Белок теплового шока Hsp70 *M. tuberculosis* может активировать ДК, благодаря его способности связываться с такими рецепторами ДК, как CD91, TLR2/TLR4, CD14 и CD40, что может существенно модифицировать свойства ДК и их способность активировать NK и другие типы лимфоцитов. В связи с этим целью настоящей работы явилось исследование ЦТА лимфоцитов и продукции ими IFNγ при взаимодействии со зрелыми интактными ДК и ДК, предварительно обработанными rHsp70 *M. tuberculosis.*

Материалы и методы. ДК готовили из моноцитов периферической крови здоровых доноров. ГМ-КСФ и IL-4 вносили в день 1, 3 и 5. В день 6 добавляли факторы созревания. Для индукции созревания ДК к ним добавляли лейкинферон, TNF-α, ПГЕ$_2$ и ЛПС. Для исследования влияния rHsp70 M.tuberculosis на ДК, зрелые ДК собирали на день 8, ресуспендировали в полной культуральной среде (ПКС), содержащей IL-4 и ГМ-КСФ и инкубировали 18 часов в присутствии rHsp70 M.tuberculosis (20 мкг/мл). ДК после отмывания смешивали с аутологическими лимфоцитами в соотношении 1:10 в 1 мл ПКС. На следующий день после стимуляции и далее два раза в неделю к клеткам добавляли 30 ед/мл IL-2 ("Sigma",США). На восьмой день проводили рестимуляцию лимфоцитов аутологическими ДК. На 7 день после рестимуляции лимфоциты собирали, отмывали ФСБ и использовали для определения цитотоксической активности (ЦТА). Каждый раз после добавления ДК к лимфоцитам через 24 часа инкубации исследовали концентрацию IFNγ с помощью ИФА, количество IFNγ-продуцирующих клеток - методом ELISPOT. ЦТА лимфоцитов исследовали в отношении клеток линии Т2 тесте с ^{3}Н-тимидином.

Результаты. Показано, что культивирование лимфоцитов с аутологическими интактными зрелыми ДК приводит к повышению ЦТА NK-клеток и продукции IFNγ. Предварительная обработка ДК rHsp70 *M. tuberculosis* значительно усиливает их способность индуцировать ЦТА NK-клеток и стимулировать продукцию IFNγ лимфоцитами. При этом обнаружено усиление продукции IFNγ лимфоцитами, секретирующими этот цитокин, а не увеличение количества IFNγ-секретирующих клеток (таблица). Обнаруженное усиление активации NK-клеток под действием ДК, предварительно обработанных rHsp70 *M. tuberculosis*, может быть одной из важных составляющих в механизме иммунотерапевтического действия противоопухолевых вакцин на основе этого белка, т.к. активированные NK-клетки элиминируют те опухолевые клетки, у которых отсутствует MHC I и которые благодаря этому ускользают от действия антиген-специфических противоопухолевых ЦТЛ.

Заключение. При взаимодействии лимфоцитов с аутологическими зрелыми ДК обнаружено повышение ЦТА NK-клеток и стимуляция продукции IFNγ лимфоцитами, а предварительная обработка ДК rHsp70 M. tuberculosis значительно усиливает их способность повышать ЦТА NK-клеток и стимулировать продукцию IFNγ лимфоцитами.

ЦИТОЛОГИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ В ОЦЕНКЕ ИММУНОТОКСИЧЕСКОГО ЭФФЕКТА НЕСИММЕТРИЧНОГО ДИМЕТИЛГИДРАЗИНА И СВЧ-ОБЛУЧЕНИЯ

Муравлева Л.Е., Койков В.В., Годунова М.И.

Карагандинская государственная медицинская академия, Караганда, Республика Казахстан

Ухудшение состояния здоровья населения регионов техногенного загрязнения окружающей среды является характерной чертой нашего времени. Организм человека оказывается под воздействием множества агрессивных факторов химической и физической природы, что приводит к снижению общей резистентности и росту неспецифической заболеваемости среди населения. В этой связи особую актуальность представляет изучение роли экзогенных факторов в механизмах снижения защитного потенциала организма. Установлено, что сочетанное действие повреждающих агентов проявляется в их взаимопотенцирующем эффекте. При этом наиболее распространенными вариантами комбинированного воздействия на живой организм являются эффекты сочетанного действия электромагнитных полей и высокотоксичных веществ. Установлено, что наиболее биологически активным частотным диапазоном электромагнитных полей является СВЧ-диапазон. К группе наиболее опасных токсикантов относятся гидразин и его производные, в частности несимметричный диметилгидразин (НДМГ).

КОЛИЧЕСТВО IFNG-ПРОДУЦИРУЮЩИХ КЛЕТОК СРЕДИ ЛИМФОЦИТОВ, ИНКУБИРОВАВШИХСЯ В ПРИСУТСТВИИ ИНТАКТНЫХ ЗРЕЛЫХ ДК ИЛИ ТАКИХ ЖЕ ДК, ОБРАБОТАННЫХ RHSP70 *M. tuberculosis*

Условия культивирования лимфоцитов	Количество IFNγ-продуцирующих клеток на 200 тыс. лимфоцитов	
	Суммарное количество	Количество клеток с высоким уровнем продукции IFNγ
Лимфоциты	4 ± 1	0 ± 0
Лимфоциты + ДК	99 ± 10	59 ± 5
Лимфоциты +(ДК+rHsp70)	110 ± 12	88 ± 6*

Примечание: *- $p<0,05$

Целью настоящего исследования явилось изучение клеточности центральных и периферических органов иммунной системы, а также лейкоцитарной формулы в организме экспериментальных животных, подвергнутых сочетанному действию НДМГ и СВЧ-облучения.

Материалы и методы. Объектом исследования служили кровь, селезенка и костный мозг крыс контрольной и опытных групп. Всего в исследование было включено 40 беспородных белых крыс обоего пола. В опытной группе (n=20, в т.ч. 10 самцов и 10 самок) животные были подвергнуты внутрижелудочному введению НДМГ в дозе 80 мг/кг массы тела, однократно, в первый день эксперимента, и ежедневному тотальному СВЧ-облучению с плотностью потока энергии 24 мВт/см^2, время экспозиции – 10 минут в сутки. В качестве источника СВЧ-излучения использовали портативный аппарат для микроволновой терапии «Луч-3». Контрольную группу (n=20, в т.ч. 10 самцов и 10 самок) составили интактные крысы. По истечении 30 суток животные умерщвлялись методом неполной декапитации. У животных извлекали селезенку и бедренную кость, отмывали в физиологическом растворе, подсушивали на фильтровальной бумаге. С помощью гомогенизатора из каждого органа отдельной крысы готовили клеточную взвесь на растворе Хенкса. Полученные суспензии из селезенки и костного мозга бедренной кости отфильтровывали через капроновую сетку от элементов стромы, подсчитывали концентрацию ядросодержащих клеток (ЯСК) стандартным методом с использованием камеры Горяева. При определении жизнеспособности в процентах выражали количество погибших клеток.Клеточный состав гемограммы определяли путем подготовки мазков из периферической крови, окраски по Романовскому-Гимзе и микрокопированием препаратов. Подсчет вели на 100 клеток и выражали в процентах. На каждого животного приготавливали по 2 препарата.

Результаты. Результаты исследования показали, что сочетанное действие НДМГ и СВЧ вызывает достоверное увеличение общего количества лейкоцитов в крови на 32,9% ($p<0,01$). Наблюдается увеличение количества палочкоядерных нейтрофилов на 55% ($p<0,01$) по сравнению с контролем, появление отдельных форм незрелых гранулоцитов – миелоцитов, метамиелоцитов. Со стороны остальных показателей лейкограммы крови крыс всех опытных групп существенных сдвигов обнаружено не было. На 30 сутки после однократного введения НДМГ и СВЧ-облучения наблюдалось достоверное снижение числа ядросодержащих клеток селезенки по сравнению с контролем, при этом процент жизнеспособных клеток не изменялся. Со стороны ядросодержащих клеток костного мозга крыс наблюдалась тенденция к снижению на 54% ($p<0,01$) при антибатном росте процента жизнеспособных клеток на 65% ($p<0,01$) по сравнению с контролем. Следовательно, СВЧ-облучение в сочетании с однократным введением НДМГ оказывает выраженный иммунотоксический эффект, что документируется выраженными изменениями со стороны лейкоцитарной формулы – смещение лейкограммы влево на фоне увеличения общего числа лейкоцитов, а также выраженной реакцией со стороны центральных и периферических органов иммунной системы – изменение количества и жизнеспособности клеток селезенки и костного мозга.

ИЗУЧЕНИЕ МЕХАНИЗМОВ ПРОТЕКТИВНОГО ИММУНИТЕТА ПРИ МУКОЗАЛЬНОЙ ИММУНИЗАЦИИ КОРПУСКУЛЯРНОЙ ГЕРПЕТИЧЕСКОЙ ВАКЦИНОЙ В ФОРМЕ СВЕЧЕЙ, СОДЕРЖАЩИХ ГИАЛУРОНОВУЮ КИСЛОТУ

Нагурская Е.Н.[1], Кобец Н.В.[1], Зайцева Л.Г[1], Киреева И.В[1]., Самойленко И.И.[1], Алимбарова Л.М[2]. Баринский И.Ф.[2,1]

[1]НИИЭМ им. Н.Ф.Гамалеи РАМН, Москва, Россия;

[2] Институт вирусологии им. Д.И. Ивановского РАМН, Москва, Россия

Введение. В настоящее время при разработке вакцинных препаратов все большее внимание уделяется режимам вакцинации. Известно, что локальная (мукозальная) вакцинация приводит к формированию локального иммунного ответа протективного характера. Такой ответ позволяет влиять на ранние этапы инфицирования слизистых покровов. Поэтому создание эффективных мукозальных вакцинных препаратов является важным направлением в борьбе с урогенитальными инфекциями, в частности с герпесвирусной инфекцией.

Цели и задачи. Целью настоящего исследования было изучение эффективности корпускулярной герпесвирусной вакцины в форме гиалуроновых свечей, на мышах линии BALB/c и DBA/2.

Материалы и методы. В настоящей работе использовалась разработанная нами модель интравагинальной герпесвирусной инфекции на мышах. Были исследованы динамика функциональной активности макрофагов и Т-клеточный иммунитет (РТММ) при заражении и вакцинации.

Основные результаты. В ходе исследований нами были выявлены различия в резистентности мышей резистентной и чувствительной линий к ВПГ-2 и ВПГ-1 при интравагинальном заражении. Так, интравагинальное заражение мышей DBA/2 ВПГ-2 и ВПГ-1 давало 100% летальность, тогда как мыши BALB/c, были устойчивы к вирусу и выживали при тех же дозах заражения. Нами впервые было показано, что использование мукозальной иммунизации корпускулярной герпесной вакциной в форме гиалуроновых свечей защищает чувствительных мышей от летальной инфекции ВПГ-2. При исследовании параметров естественной резистентности и адаптивного иммунитета у чувствительных мышей DBA/2 и резистентных BALB/c были выявлены существенные различия. Так интравагинальное заражение мышей устойчивой линии (BALB/c) ВПГ-1 приводило к значительному усилению активности катепсина D и функции захвата антигена на поздние сроки. В отличие от мышей BALB/c у мышей чувствительной линии DBA/2 были снижены все изучаемые показатели, особенно в течение первых суток исследования. Динамика ответа мышей BALB/c на ВПГ-2 по сравнению с ВПГ-1 была иной, так, пик активности макрофагов наблюдался в самые ранние сроки (2 часа после заражения). Интравагинальная вакцинация мышей BALB/c приводила к усилению функции захвата антигена на 9 сутки, а последующее заражение на фоне высокой активности, обеспечиваемой вакцинацией, вызывало резкое снижение функции захвата уже в первые часы. Мы выявили различия в специфическом Т клеточном ответе, регистрируемом в РТММ, у мышей чувствительной и резистентной линии при интравагинальном заражении ВПГ-1. При интравагинальном заражении

мышей BALB/c ВПГ-2 после иммунизации их исследуемым препаратом наблюдалась тенденция к снижению этого ответа, что, возможно, отражает регуляторный характер мукозальной вакцинации.

Заключение. Полученные нами данные свидетельствуют о перспективности дальнейших исследований по изучению мукозальных вакцинных препаратов на модели интравагинального заражения, как наиболее соответствующего естественным путям инфицирования.

ПЕНТРАКСИНЫ И НЕЙРОМЕДИАТОРЫ

Назаров П.Г., Нежинская Г.И., Бутюгов А.А., Трулев А.С.

Институт экспериментальной медицины РАМН, Санкт-Петербург, Россия

Пентраксины представляют собой увеличившееся за последние годы семейство сывороточных и клеточных белков, содержащее молекулы разной величины: короткие пентраксины – С-реактивный белок (CRP) и сывороточный Р-компонент амилоида (SAP) и длинные пентраксины – пентраксины-3 и -4 (PTX3, PTX4), нейрональный пентраксин-1 (NP-1), пентраксин, регулируемый нейрональной активностью (neuronal activity-regulated pentraxin, NARP; или NP2), и нейрональный пентраксиновый рецептор (neuronal pentraxin receptor) [Schlimgen et al., 1995; Goodman et al., 1996; Dodds et al., 1997; Kirkpatrick et al., 2000]. Общим свойством является наличие у пентраксинов пентамерного строения молекулы (у CRP она состоит из 5 идентичных субъединиц по 21,5 кДа) и сродства к определенным лигандам. Общим лигандом для коротких пентраксинов является фосфорилхолин и подобные ему вещества (липопротеины низкой плотности, лецитин и другие), а общим свойством всего семейства – кальций-зависимое взаимодействие с такими лигандами.

Группа пентраксинов, связанных с нервной системой, участвует регуляции физиологической активности синапсов. Это секретируемые гликопротеины, обладающие двумя доменами: N-концевым, отвечающим за самоагрегацию молекул, и С-концевым, участвующим в аксонном транспорте и секреции и называемым пентраксиновым доменом из-за сходства его аминокислотной последовательности с CRP и SAP. Функция пентраксина NARP (NP-2) – участие в регуляции сборки глутаматных AMPA-рецепторов в синапсах. Нейрональный пентраксин-1 (NP-1) также экспрессируется в ЦНС, его ген активируется при гипоксии/ишемии мозга. NP-1 взаимодействует с возбуждающими постсинаптическими глутаматными AMPA- и NMDA-рецепторами и находится в кластерах глутаматных рецепторов GluR1. Поскольку экспрессия генов нейрональных пентраксинов и их синтез усиливаются при ишемическом поражении мозга и гибели его клеток, считают, что эти пентраксины обслуживают процесс апоптоза и ускоряют гибель нейронов, выполняя адапторные функции или являясь скевенджер-факторами, элиминирующими поврежденный биологический материал. Высказывалось предположение, что в нормально функционирующих синапсах нейрональные пентраксины могут связывать отработанные молекулы нейромедиаторов.

Сывороточные пентраксины CRP и SAP являются маркерами острой фазы воспаления у человека и мыши. Их синтез многократно возрастает в острой фазе воспаления, при травме, облучении. Они выполняют защитные функции, связывают микробные антигены, токсины, активируют комплемент и продукцию активных форм кислорода в нейтрофилах, усиливают фагоцитоз. Учитывая сродство CRP и SAP к фосфорилхолину, мы исследовали возможность взаимодействия CRP с родственным веществом – ацетилхолином, медиатором парасимпатической нервной системы, продуцирующимся, как теперь известно, и клетками иммунной системы. Наши исследования показали, что в результате короткой (15 мин) инкубации ацетилхолина с очищенным CRP человека ацетилхолин практически полностью утрачивает способность вызывать замедление ритма сердца у крыс и достоверно снижает свое гипотензивное действие. Нами показано, что CRP дозозависимо ингибирует разрушение ацетилхолина холинэстеразой *in vitro*, что указывает на то, что пентраксин связывает ацетилхолин и защищает его от действия фермента. CRP не взаимодействовал с ацетилхолинэстеразой.

Контрольные опыты на крысах, которым вместо ацетилхолина вводили аденозин, вызывающий похожие эффекты (снижение артериального давления и брадикардию) без вовлечения ацетилхолиновых рецепторов, показали, что смешивание аденозина с CRP не оказывало достоверного эффекта на его физиологическую активность у животных: CRP не снижал гипотензивный эффект аденозина и не изменял влияние аденозина на частоту сердечных сокращений. Таким образом, исследование эндотелий-зависимых (вызываемых ацетилхолином) и эндотелий-независимых (вызываемых аденозином или нитропруссидом натрия) реакций сосудов и сердца показало, что пентраксин CRP влияет только на эндотелий-зависимые, обусловленные действием ацетилхолина на холинорецепторы эндотелия сосудов. Результаты проведенных исследований указывают на то, что сывороточный пентраксин, синтезирующийся в организме, главным образом, в острой фазе воспаления, способен связывать и нейтрализовать медиатор парасимпатической системы ацетилхолин. «Холинолитическое» действие CRP свидетельствует о том, что данный пентраксин может принимать участие не только в регуляции сосудистого тонуса и сердечного ритма, но и в ослаблении автономной холинергической регуляции во время воспаления.

Поддержано грантом РФФИ 06-04-49629-а.

ВОСПРИИМЧИВОСТЬ *NRAMP1^R* МЫШЕЙ ИНБРЕДНОЙ ЛИНИИ I/ST К ИНФЕКЦИЯМ, ВЫЗЫВАЕМЫМ ТАКСОНОМИЧЕСКИ НЕ РОДСТВЕННЫМИ ВИДАМИ БАКТЕРИЙ С ВНУТРИКЛЕТОЧНЫМ ТИПОМ ПАРАЗИТИЗМА (*MYCOBACTERIUM TUIBERCULOSIS* , *SALMONELLA TYPHIMURIUM И CHLAMYDIA PNEUMONIAE)*

Нестеренко Л.Н.[1], Балунец Д.В.[1], Романова Ю.М.[1], Аляпкина Ю.С.[1], Зигангирова Н.А.[1], Капина М.А.[2], Кондратьева Е.В[2], Майоров К.Б.[2], Пичугин А.В. [2], Апт А.С.[2]

[1]ГУ НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Гамалеи РАМН;

[2]ГУ Центральный НИИ туберкулеза РАМН

Введение. Мыши инбредной линии I/St чувствительны к туберкулезной инфекции, течение которой у них характеризуется выраженными воспалительными реакциями в легких. Чувствительность линии I/St к туберкулезу не связана с функцией *Nramp1* гена, поскольку мыши I/St несут аллель *Nramp1*^{r}.

Цель и задачи. Чтобы проверить, не связана ли чувствительность к туберкулезу линии I/St с чувствительностью к другим внутриклеточным паразитам, в настоящей работе изучали течение экспериментальных инфекций, вызванных таксономически не родственными микобактериям видами - *Chlamydia pneumoniae* и *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium*.

Материалы и методы. Использовали инбредные линии мышей I/StSnEgYCit (I/St) и A/JSnYCit (A/Sn), чувствительные и устойчивые к туберкулезной инфекции соответственно. Мышей весом 16-18 г заражали внутрибрюшинно дозой10 КОЕ/мышь штамма C53 *S. typhimurium*. Высевы из селезенки и брюшной полости мышей производили на различных сроках инфекции на SS-агар. Мышей весом 8-10 г заражали интерназально дозой 10^4 ВОЕ/мышь суспензии элементарных телец штамма *C. pneumoniae* Kajjani 6. Оценку количества хламидий в легких на различных сроках инфекции производили методом ПЦР в реальном времени. Гистологические срезы легких были приготовлены на 6-8 сутки после заражения мышей хламидиями. Оценка показателей иммунного ответа была проведена по изучению макрофагального ответа (антисальмонелльной активности перитониальных макрофагов *in vitro*) и по определению уровня цитокинов в перитониальном лаваже методом ELISA. Для характеристики местной воспалительной реакции в брюшной полости оценивали изменение состава клеток в перитониальном экссудате методом проточной цитофлуорометрии.

Основные результаты. В обеих моделях (хламидийная и сальмонеллезная инфекция) продолжительность жизни мышей линии I/St была значительно короче (примерно в 2 раза) по сравнению с продолжительностью жизни устойчивых к туберкулезу *Nramp1*^{r} мышей инбредной линии A/Sn. Мыши линий I/St и A/Sn проявляли схожую способность контролировать размножение хламидий в легких, однако развитие хламидийной инфекции у мышей линии I/St сопровождалось значительно более выраженными патоморфологическими изменениями легочных тканей. Высеваемость сальмонелл из брюшной полости и селезенки на ранних стадиях инфекции (в течение первых двух суток после заражения, но не на более поздних стадиях инфекции), была значительно выше (~3 log) у мышей линии I/St. Перитониальные макрофаги линии I/St проявляли наибольшую пермиссивность к размножению сальмонелл также в течение первых двух суток после заражения *in vitro*. Изучение локального иммунного ответа в брюшной полости методом проточной цитофлуометрии через 24 часа после инфекции показало, что макрофаги составляли около половины общего количества клеток, содержащихся в перитониальном экссудате, в то время как Т клетки присутствовали в очень небольших количествах, как у линии I/St, так и у A/Sn. У мышей устойчивой линии A/Sn было выявлено значительно большее количество $CD19^+$ В клеток, чем у мышей линии I/St. Определение методом ELISA продукции ключевых эффекторных и воспалительных цитокинов в брюшной полости на ранней стадии инфекции показало наличие значительно (P<0,05) больших количеств провоспалительных цитокинов TNF-α и IL-6 у мышей линии I/St по сравнению с мышами линии A/Sn.

Заключение. *Nramp1*^{r} мыши инбредной линии I/St, чувствительные к туберкулезной инфекции, оказались также восприимчивы к сальмонеллезной и хламидийной инфекциям, сопровождавшимися развитием выраженных местных воспалительных реакций. Поскольку различия в продолжительности жизни у мышей линий I/St и A/Sn не коррелировали напрямую с различиями в способности ограничивать размножение сальмонелл и хламидий, можно предположить, что оба инфекционных агента запускают фатальный патологический процесс на ранних стадиях инфекции, динамика которого детерминирована генетикой хозяина.

ВЛИЯНИЕ БАКТЕРИЙ РОДА *LACTOBACILLUS* НА КЛЕТОЧНЫЕ ФАКТОРЫ ИММУНИТЕТА ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ШИГЕЛЛЕЗНОЙ ИНФЕКЦИИ

Николаева Т.Н., Зорина В.В.

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

Бактерии рода *Lactobacillus*, являясь экологически доминирующими в кишечнике человека, оптимизируют его функции в условиях физиологической нормы и при лечении острых кишечных инфекций (ОКИ), участвуют в формировании местной и системной резистентности макроорганизма.

Цель работы: изучение влияния бактерий рода *Lactobacillus* на функциональную активность иммунокомпетентных клеток и экспрессию генов и продукцию цитокинов клетками лимфоидных органов при развитии экспериментальной шигеллезной инфекции.

Задачи исследования. Изучить значение инвазивных и токсигенных свойств *Shigella dysenteriae1* на экспрессию генов цитокинов клетками пейеровых бляшек (ПБ), продукцию интерферонов (IFN) клетками лимфоидных органов мышей СВА. Оценить особенности развития клеточных иммунных реакций при экспериментальной шигеллезной инфекции, обусловленной генетически родственными мутантами *S.dysenteriae1*, на фоне предварительного перорального введения бактерий рода *Lactobacillus*.

Материалы и методы. Для моделирования инфекционного процесса использовали штаммы *S.dysenteriae1*: вирулентный (инвазивный и токсигенный) SC500 (inv^+tox^+), инвазиный и нетоксигенный мутант SC501 (inv^+tox^-), неинвазивный токсинообразующий SC502 (inv^-tox^+) соответственно, в дозе $4x10^8$КОЕ/мл. Штаммы лактобактерий (ЛАБ) *L.fermentum 2998*, *L.plantarum 30*, *L.acidophilus NK1*, *L.acidophilus R3*$_{III}$*24*, *L.acidophilus D4A* в дозе $1x10^9$КОЕ/мл.

Экспрессия генов цитокинов выявлена методом обратной транскрипции и полимеразной цепной реакции (ОТ-ПЦР). Титры IFN определялись в сыворотке крови, супернатантах клеток ПБ, селезенки и тимуса. Пролиферативная активность иммунокомпетентных Т- и В-лимфоцитов изучена в реакции бласттрансформации (РБТЛ).

Результаты. Анализ экспрессии генов цитокинов в клетках ПБ при моделировании шигеллезной инфекции выявил зависимость спектра активированных генов от генетически детерминированных инвазивных и токсигенных свойств *S.dysenteriae1*. Вирулентный штамм SC500 (inv^+tox^+) индуцирует синтез мРНК провоспалительных цитокинов (IFNγ, интерлейкина (IL)18) и противовоспалительных IL-4 и IL-10 по сравнению с показателями интактного контроля (IL-6, IL-12 и фактор некроза опухолей (TNF)α). Инвазивный и нетоксигенный мутант SC501(inv^+tox^-) стимулирует активацию генов IFNγ, IL-1β, IL-18 и IL-4, тогда как неинвазивный и токсигенный штамм SC502 ($inv\ tox^+$) не вызывет синтеза мРНК

последнего. Экспрессия генов провоспалительных цитокинов (IFNγ, IL-1β и IL-18) отражает активацию Тх1 звена иммунного ответа, а синтез мРНК IL-4 и IL-10, свидетельствует об усилении функций субпопуляции Тх2 и В-лимфоцитов, в первую очередь, за счет реализации инвазивных свойств.

Предварительное пероральное введение ЛАБ мышам и последующее их заражение вирулентным штаммом SC500 индуцирует активацию провоспалительных цитокинов (IFNγ, IFNα, IL-1β), но не IL-4 и IL-10. Это свидетельствует о способности ЛАБ стимулировать и поддерживать развитие клеточно-опосредованных иммунных реакций организма при шигеллезной инфекции. Кроме того, полученные данные отражают роль ЛАБ в обеспечении колонизационной резистентности, направленной на подавление инвазии патогена.

Изучение продукции IFN клетками лимфоидных органов и сывороточного IFN при экспериментальном инфекционном процессе выявило, что вирулентный штамм SC500 (inv^+tox^+) индуцирует синтез IFNγ через 48 часов после заражения, что соответствует пику продукции данного цитокина и подтверждается результатами ОТ-ПЦР анализа. Инвазивный и нетоксигенный мутант SC501 оказывает менее выраженный индуцирующий эффект.

Предварительное введение ЛАБ мышам и последующее из заражение штаммом SC500 (inv^+tox^+) вызывает рост титров IFNα в супернатантах клеток лимфоидных органов через 24 часа (пик продукции цитокина). Штамм *L.fermentum* 2998 также индуцирует синтез IFNγ спустя 48 часов после заражения, при этом титры цитокина превышают в 2 раза таковые в группе зараженных животных без предварительного введения ЛАБ.

Таким образом, рост титров IFN при экспериментальном шигеллезном процессе у животных с предварительным введением ЛАБ свидетельствует о готовности организма к реакции на заражение.

Изучение роли инвазивных и токсигенных свойств штаммов *S.dysenteriae1* в стимуляции функциональной активности иммунокомпетентных Т- и В-лимфоцитов выявило, что все штаммы вызывают преимущественную стимуляцию пролиферации спленоцитов в присутствии В-клеточного митогена ЛПС ($p<0,05$).

Предварительное введение мышам бактерий *L.acidophilus* NK1 и последующее их заражение вирулентным штаммом SC500 нивелирует разрыв между показателями пролиферации В- и Т-лимфоцитов селезенки ($p<0,05$). Это отражает способность ЛАБ поддерживать пролиферацию Т-клеточного звена иммунного ответа при развитии шигеллезной инфекции. Полученные данные коррелируют с ростом титров IFN, свидетельствующем об усилении функциональной активности иммунокомпетентных Т-лимфоцитов, как основных клеток-продуцентов.

Заключение: результаты проведенной работы выявили ведущую роль инвазивных свойств *S.dysenteriae 1* в активации клеточных факторов иммунного ответа. Развитие экспериментального инфекционного процесса на фоне предварительного введения ЛАБ характеризуется усилением функций Т-клеточного звена иммунного ответа, активацией экспрессии генов провоспалительных цитокинов, но не IL-4 и IL-10, и продукции IFNα и IFNγ клетками лимфоидных органов. Полученные данные свидетельствуют об иммунокорригирующем действии ЛАБ и обосновывают их использование для профилактики и терапии ОКИ.

ВЛИЯНИЕ ВИЛОНА НА СТРУКТУРУ ТИМУСА И НАДПОЧЕЧНИКОВ НА ФОНЕ ОЖОГОВОЙ БОЛЕЗНИ И СТРЕССА В УСЛОВИЯХ ЭКСПЕРИМЕНТА

Обыденко В.И., Патеюк А.В., Баранчугова Л.М., Русаева Н.С., Лаба Е.М.

Читинская государственная медицинская академия, Чита, Россия

Проблема изучения регуляторных механизмов поддержания гомеостаза занимает особое место в современной медицине. Известно, что при ожоговой болезни развивается иммуносупрессия, сопровождающаяся нарушением функции тимуса и надпочечников. Нами было решено изучить, как изменяется морфология этих органов, а также возможность коррекции указанных нарушений. Наше внимание привлек тимомиметик – вилон (Lys-Glu), полученный путем направленного химического синтеза на основании исследования состава аминокислот тималина (Хавинсон В.Х., 1999). Известно, что вилон обладает выраженными иммуномодулирующими свойствами, способствует нормализации системы гемостаза, проявляет противоопухолевое действие и может применяться в качестве стимулятора регенерации при нарушении репаративных процессов.

Целью нашего исследования явилось изучение действия вилона на структуру тимуса и надпочечников на фоне ожоговой болезни и иммобилизационного стресса. Эксперименты выполнены на 200 белых беспородных крысах-самцах в возрасте 5-6 месяцев, массой 180-200 граммов.

У первой группы путем термокоагуляции моделировали кожное «окно» на затылочной поверхности головы крысы площадью 100 мм I (ожог IIIа-IIIб). У второй группы кроме ожога вызывали 48-часовой иммобилизационный стресс. Третьей группе – с иммобилизационным стрессом и термической травмой – вводили вилон в дозе 0,1 мг/кг массы ежедневно в течение 10 дней, начиная с третьих суток после травмы. Для контроля использовали интактных крыс.

Через сутки после травмы в тимусе экспериментальных животных развивались признаки акцидентальной инволюции. На этом фоне происходило уменьшение массы органа. Такое состояние с незначительной динамикой наблюдалось практически до пятых суток. В дальнейшем тимус животных, получавших вилон, активно заселялся лимфоцитами и происходило восстановление коркового вещества. Кроме того, у таких крыс в вилочковой железе увеличивалось число тканевых базофилов, тогда как в тимусе интактных животных выявлялись лишь единичные тучные клетки.

Через 14 дней после травмы у животных первой группы лимфоциты появлялись только в субкапсулярной зоне, образуя тонкий, местами прерывающийся слой; у животных второй группы динамика была незначительной; у третьей группы животных (получавших вилон) полностью восстанавливалось корково-мозговое соотношение, но в корковом веществе отдельных долек выявлялись шаровидные образования, схожие по своему строению с мозговым веществом. Полное восстановление цитоархитектоники долек тимуса у животных третьей группы наблюдалось на 21 сутки. При этом в корковом веществе формировались особые структуры разнообразной формы и конфигурации, в которых располагались плотно контактирующие друг с другом лимфоциты. Такие образования имели самую разнообразную локализацию и выраженную структурированную границу, состоящую из тонких ретикулиновых волокон.

Через сутки после термической травмы надпочечники резко увеличивались в размерах. У таких животных выявились морфологические признаки повышения функциональной активности коркового вещества, причем более выраженные изменения были у стрессированных крыс. Через трое суток после термической травмы надпочечники всех трёх групп экспериментальных животных продолжали увеличиваться в размерах.

На пятые сутки при морфометрическом исследовании у животных первой группы значительной динамики не отмечалось; у крыс второй группы наблюдалось дальнейшее увеличение массы надпочечников. У крыс, получавших вилон, надпочечники даже уменьшались в размерах. Одновременно у таких крыс отмечалось уменьшение размеров всей корковой зоны. У животных, получавших вилон, мы выявили на границе коркового и мозгового вещества скопления тканевых базофилов на стадии активной дегрануляции. Подобные факты не наблюдались ни в первой, ни во второй группах животных.

Под влиянием вилона восстанавливалась морфофункциональная структура тимуса, значительно быстрее нормализовалась его масса, увеличивалось количество лимфоцитов в корковом веществе с образованием обособленных групп лимфоцитов, ослаблялась гипертрофия надпочечников, что приводило к снижению активности стресс-системы.

ЛИЗОМУСТИН - ОТЕЧЕСТВЕННЫЙ ПРОТИВООПУХОЛЕВЫЙ ПРЕПАРАТ, ИНДУЦИРУЮЩИЙ АПОПТОЗ

Огородникова М.В., Барышников А.Ю.

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

Цель работы. Исследование апоптоза, индуцированного действием противоопухолевого препарата лизомустин.

Материалы и методы. *Определение апоптоза методом двойного окрашивания An/PI.* К суспензии клеток линии U937 ($5x10^4$ клеток/180 мкл среды) добавляли 20 мкл препарата в концентрациях $0,5*10^{-5}$М, $1*10^{-5}$М, $1*10^{-4}$М и инкубировали 24,36,48 часов при 37°С в атмосфере 5% CO_2. Контролем служили интактные клетки, которые инкубировали в тех же условиях, но в отсутствие препарата. После окончания инкубации клетки окрашивали Аннексином V FITC (AnV) (Caltag,США) и пропидиум иодидом PI (Sigma) по стандартной методике. Оценку проводили по следующим критериям: живые клетки ($AnV^- PI^-$), ранние апоптотические клетки ($AnV^+ PI^-$), предположительно поздние апоптотические или некротические клетки ($AnV^+ PI^+$). *Определение активной каспазы-3.* Суспензию клеток (после инкубации с химиопрепаратами в течение 24 часов, 48 часов) в количестве $1*10^6$ обрабатывали в соответствии с инструкцией к набору Active Caspase-3 Mab Apoptosis KitI (BD PharMingen,США) и инкубировали с FITC- мечеными МКА к активной каспазе-3 из состава набора. Контролем служили интактные клетки, которые инкубировали в тех же условиях, но в отсутствие препарата. Анализ проводили методом проточной цитофлуориметрии.

Результаты. Под действием лизомустина в концентрациях $0,5*10^{-4}$М, $1*10^{-4}$М (инкубация 24 часа) количество клеток в раннем апоптозе ($AnV^+ PI^-$) составило 1,2; 3,7%, соответственно. Количество клеток, положительных по AnV^+ и PI^+ (предположительно поздние апоптотические или некротические клетки) составило 3,3; 5,4% соответственно. При увеличении времени инкубации до 36 часов под действием лизомустина количество клеток в раннем апоптозе ($AnV^+ PI^-$) увеличилось и составило 6,8; 11,2% соответственно. Количество положительных по AnV^+ и PI^+ клеток также увеличилось и составило 21,8; 42,1%. При увеличении времени инкубации до 48 часов количество клеток в раннем апоптозе значительно уменьшилось ($AnV^+ PI^-$) и составило 1,7; 1,0%, количество клеток, положительных по AnV^+ и PI^+, увеличилось и составило 12,9; 46,5% соответственно. При исследовании активации каспазы-3 через 24 часа инкубации с лизомустином в концентрациях, $0,5*10^{-4}$М, $1*10^{-4}$М количество клеток, экспрессирующих активную каспазу-3, составило 16,8; 15,5%. После увеличения времени инкубации до 48 часов процент экспрессирующих клеток возрос и составил 31,6; 76,5%, соответственно.

Заключение. Количество клеток в позднем апоптозе и некрозе увеличивается прямо пропорционально времени инкубации и дозе препарата. Количество ранних апоптотических клеток при увеличении времени инкубации постепенно снижается. Экспрессия активной каспазы-3 заметно повышается при увеличении времени инкубации и дозы лизомустина. Таким образом, на основе вышеизложенных данных можно сделать вывод, что лизомустин эффективно индуцирует гибель опухолевых клеток по типу апоптоза.

ЛЕПТИН КАК ВОЗМОЖНЫЙ МОДУЛЯТОР МИКРОБИЦИДНОЙ АКТИВНОСТИ МОНОЦИТОВ ПРИ БЕРЕМЕННОСТИ

Орлова Е.Г., Ширшев С. В.

Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН, Пермь, Россия

Лептин является пептидным гормоном, который синтезируется, главным образом, адипоцитами. Основная биологическая роль лептина связана с регуляцией энергетического баланса организма и ограничением избыточного накопления жировой массы. Участие лептина в регуляции иммунных реакций определяется его непосредственным влиянием на клетки иммунной системы, которые экспрессируют специфические рецепторы. Уровень лептина значительно нарастает во время беременности, особенно во втором триместре. Лептин является провоспалительным гормоном, который способствует преобладанию клеточно-опосредованного иммунного ответа. Однако роль данного гормона в регуляции иммунных реакций при беременности остается практически не изученной. По данным литературы моноциты/макрофаги экспрессируют наибольшее количество рецепторов к лептину. Известно, что во время беременности моноциты/макрофаги активно инфильтрируют децидуальную ткань и плаценту, выполняя регуляторные функции, поэтому исследование механизмов гормонального контроля функциональной активности этих клеток приобретает особое значение.

Цель настоящей работы - исследовать влияние лептина в дозах, сопоставимых с концентрацией гормона в I и II-III триместрах беременности, на микробицидную активность моноцитов человека в модели *in vitro*.

Материалы и методы. В работе использовали фракционированные моноциты периферической крови здоровых небеременных женщин (фолликулярная фаза). Мононуклеарные клетки получали центрифугированием в градиенте плотности фиколл-верографина (1,077 г/$см^3$); полученную суспензию после двойной отмывки средой 199 поме-

щали на чашки Петри с 5% ЭТС и инкубировали 45 мин при 37°С, затем адгезированные моноциты снимали механическим способом, дважды отмывали и стабилизировали инкубированием в течение 45 мин при 4°С. Полученные клетки ($2x10^6$ в пробе) инкубировали в течение часа при 37°С с лептином ("Sigma") в дозах 10 и 35 нг/мл, сопоставимых с концентрацией гормона в I и II-III триместрах беременности. Влияние лептина на биоцидный потенциал оценивали по уровню активностей ферментов, секретируемых моноцитами: эластазы, катепсина G и миелопероксидазы (МПО), которые определяли в клеточных супернатантах с использованием стандартных наборов спектрофотометрическим методом. Влияние лептина на микробицидный потенциал оценивали по интенсивности люминолзависимой хемилюминесценции. В качестве стимулятора клеток использовали зимозан А ("Sigma"), опсонизированный пулом сывороток. Для исследования механизмов модулирующих эффектов гормона использовали блокатор scavenger-рецепторов (Poly I:C). Достоверность различий оценивали с помощью парного *t*-критерия Стьюдента.

Результаты. Секреция МПО, протеиназ и продукция активных кислородных метаболитов являются важнейшим механизмом бактерицидности моноцитов, обеспечивающим не только неспецифическую резистентность организма, но и активно участвующим в процессах ремоделирования тканей при беременности. Установлено, что лептин в дозах, сопоставимых с концентрацией гормона в I и II-III триместрах беременности, разнонаправленно модулировал активность нейтральных протеиназ. Гормон усиливал активность эластазы и угнетал активность катепсина G, при этом достоверных различий в действии изучаемых доз выявлено не было. Блокада скавенджер-рецепторов отменяла стимулирующий эффект лептина на ферментативную активность эластазы, однако угнетение катепсина G сохранялось и при использовании блокатора скавенджер-рецепторов. Лептин в исследуемых дозах стимулировал активность МПО, секретируемой моноцитами. На фоне блокады скавенджер-рецепторов активирующее действие гормона сохранялось. Анализ спонтанной продукции активных кислородных метаболитов не выявил модулирующей активности лептина. В стимулированном варианте максимум активации под действием низкой дозы гормона отмечался на 5-й мин, а высокой дозы гормона на 10-й мин. Блокада скавенджер-рецепторов отменяла стимулирующее действие обеих доз гормона и приводила к угнетению продукции активных форм кислорода.

Заключение. Таким образом, лептин может выступать одним из существенных регуляторов микробицидной активности моноцитов при беременности. Молекулярный механизм действия гормонального рецептора лептина связан с работой скавенджер-рецепторов.

ВЛИЯНИЕ ГИПОФИЗЭКТОМИИ, ПРОИЗВЕДЕННОЙ В РАЗЛИЧНЫЕ ПЕРИОДЫ ЖИЗНИ ЦЫПЛЯТ, НА ТУЧНОКЛЕТОЧНУЮ РЕАКЦИЮ В СУМКЕ ФАБРИЦИУСА

Патеюк А.В., Кузник Б.И., Баранчугова Л.М., Русаева Н.С, Обыденко В.И., Лаба Е.М.

Читинская государственная медицинская академия, Чита, Россия

Предыдущие наши исследования показали, что удаление гипофиза у птиц сопровождается иммунодефицитом и нарушением структурной организации как тимуса, так и бурсы. В данной работе мы изучили, как изменяется активность тучных клеток в сумке Фабрициуса при гипофизэктомии, произведенной на различных сроках жизни птиц.

В эксперименте использованы 200 цыплят породы Леггорн-КРОСС «Родонит-2» линия РС. Цыплята были разделены на 8 групп по 25 в каждой. Первым 4 группам цыплят удаляли гипофиз на 1, 5, 21 и 45 день жизни, а остальные птицы служили контролем. Забор материала для исследования производили на 5, 21 и 45 сутки после операции. Исследуемый материал подвергался морфометрическому анализу и специальным методам окраски на тучные клетки и гранулы.

Нами выявлены закономерности в реакции тучноклеточного компонента в бурсе птиц в ответ на гипофизэктомию. Главной из них является однотипность и этапность происходящих с тучными клетками сумки Фабрициуса изменений как количественного, так и качественного характера. Так, на пятые сутки после гипофизэктомии во всех исследуемых группах была отмечена массовая дегрануляция лаброцитов как в строме, так и в паренхиме сумки Фабрициуса. Процесс дегрануляции был настолько активен, что зёрна тучных клеток создавали ореол, а сами клетки превращались в «тени», т.е. в составе их цитоплазмы определялись лишь единичные гранулы. На этом этапе морфологически отмечались все явления, вызываемые содержащимися в гранулах биологически активными веществами, особенно гистамином, гепарином, лейкотриенами и тромбоксаном. На этой стадии выявлялся самый выраженный отек интерстиции ворсинок бурсы. Особенно следует отметить, что на пятые сутки после гипофизэктомии во всех группах наблюдались особо интенсивные признаки отека в стенке бурсы. Каждый из фолликулов был окружен цепочкой дегранулировавших тучных клеток, а вокруг центрально проходящего кровеносного сосуда, как футляр, располагались лаброциты, завершающие дегрануляцию, или клетки «тени».

При анализе состояния тучноклеточного компонента на 21 день после гипофизэктомии была выявлена совершенно иная картина: в бурсе количество тучных клеток возрастало в десятки раз, и в них практически отсутствовали признаки дегрануляции.

Наиболее интересные данные в реакции тучных клеток на гипофизэктомию были получены на 45 сутки после операции. В лимфоидных фолликулах бурсы обычными методами не определялись тучные клетки, но при использовании комбинированного метода на кислые и нейтральные полисахариды по Lev Spiser были обнаружены ШИК-позитивные тучные клетки. В их цитоплазме не выявлялись кислые глюкозаминогликаны, такие как гепарин, хондроэтинсульфат, а вся содержащаяся зернистость была ШИК-позитивной, что указывает на содержание в ней нейтральных сложных углеводов. Такие ШИК-позитивные тучные клетки в бурсе чаще всего определялись под эпителием в контакте с базальной мембраной.

Таким образом, независимо от срока после удаления гипофиза в бурсе отмечается четкая стадийность тучноклеточной реакции. При этом тучноклеточная реакция после гипофизэктомии протекает в три стадии: 1. дегрануляция, 2.пролиферация и 3. изменение фенотипа для продукции качественно иных химических компонентов. Все эти стадии, несомненно, отражаются на функциональном состоянии сумки Фабрициуса, создавая компенсаторно-адаптивные условия в организме животного.

ВЛИЯНИЕ МАЗИ «ВЕРМИН» НА ФАГОЦИТАРНУЮ АКТИВНОСТЬ НЕЙТРОФИЛОВ ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ РАНЕВОЙ ИНФЕКЦИИ

Перевозчикова Е.Н., Сафонова Г.М.

Филиал ФГУП «НПО «Микроген» МЗ и СР РФ «Пермское НПО «Биомед», Пермь, Россия

Поиск новых эффективных лекарственных средств, ускоряющих сроки очищения и заживления ран, оказывающих стимулирующее действие на иммунную систему организма, продолжает оставаться актуальной задачей. Нами ранее показано, что препарат «Вермин», полученный из биомассы красного калифорнийского дождевого червя, обладает иммуномодулирующим действием и может быть использован для лечения длительно незаживающих гнойных ран (патент № 2119340 от 27 сентября 1998 года). На основе данного препарата разработана мазь «Вермин».

Цель работы. Изучить влияние мази «Вермин» (двух составов) на процессы фагоцитоза при экспериментальной раневой инфекции.

Материалы и методы. Моделирование раневой инфекции осуществляли в соответствии с «Методическими рекомендациями по экспериментальному (доклиническому) изучению лекарственных препаратов для местного лечения гнойных ран (издание официальное)» (МЗ СССР. Фармакологический комитет. М.,1989). В экспериментах использованы крысы-самцы Wistar массой 140-160 г. В качестве инфицирующего агента использовали культуры золотистого стафилококка и синегнойной палочки. На 4-е сутки после заражения у всех животных образовались сопоставимые по величине раны, содержащие некротические ткани и значительное количество гнойного отделяемого. Затем на 5-е сутки (1-й день лечения) проведено иссечение кожи над гнойником под эфирным наркозом и далее каждый день проводили обработку ран антисептиками (3% перекись водорода, фурациллин 1:5000). Животным опытных групп, кроме этого, на рану наносили мазь «Вермин» двух составов. В 1-й, 3-й, и 7-й день лечения были взяты мазки-отпечатки из раны. Результаты изучения цитограмм представлены в таблице.

Основные результаты. В первый день лечения различий в величинах определяемых показателей в контрольной и опытных группах не наблюдалось. На 3-и сутки у животных контрольной группы выявлено значительное снижение процента фагоцитоза и фагоцитарной активности нейтрофилов, при этом, отмечен высокий уровень дегенеративно-измененных форм. Эта тенденция в контрольной группе сохранилась в более выраженной форме к 7-м суткам. Применение мази «Вермин» (состав 2, патент № 2180574 от 20 марта 2002 года) способствовало повышению фагоцитарной активности нейтрофилов в ране и уменьшению дегенеративных форм (таблица).

Заключение. Проведенные исследования показали, что применение мази «Вермин» способствует стимуляции местного иммунитета в ране - увеличению количества фагоцитирующих нейтрофилов, усилению их фагоцитарной активности, уменьшению дегенеративно-измененных форм. Это приводит к сокращению сроков очищения и заживления раны.

ЭКСПРЕССИЯ БЕЛКА C-FOS В КЛЕТКАХ ГИПОТАЛАМИЧЕСКИХ СТРУКТУР ПРИ ВВЕДЕНИИ АНТИГЕНОВ РАЗЛИЧНОЙ ПРИРОДЫ

Перекрест С.В., Гаврилов Ю.В., Новикова Н.С., Корнева Е.А.

ГУ НИИ экспериментальной медицины РАМН, Санкт-Петербург, Россия

Введение. Особый интерес представляет сравнительный анализ паттернов активации структур мозга в ответ на введение антигенов различной природы, инициирующих разные пути развития иммунного ответа.

Целью данной работы являлось выявление степени активации гипоталамических структур по экспрессии белка c-Fos в ответ на введение антигенов различной природы: липополисахарида (ЛПС) и бычьего сывороточного альбумина (БСА).

Материал и методы. Работа выполнена на 50 крысах, самцах породы *Wistar*, весом 200-250 г, которым внутривенно вводили 25 мкг/кг ЛПС (*E.coli* 055:B5, SIGMA) или 25 мг/кг БСА (SIGMA). Иммуногистохимическое выявление c-Fos-позитивных клеток проводили на срезах мозга, фиксированного через 2 часа после введения антигена. Препараты анализировали при помощи системы Ista-Видео-Тест. Определяли общее число c-Fos-позитивных клеток, относительный коэффициент (ОК), как отношение их числа после введения антигена к их количеству у контрольных животных (введение физиологического раствора), и показатель относительной оптической плотности (ООП) окраски c-Fos-позитивных клеток (отношение их средней оптической плотности к средней оптической плотности фона). Применение коэффициентов (ОК и ООП) позволило не только определить изменение уровня экспрессии белка c-Fos в отдельной структуре, но и провести сравнительный анализ степени активации нескольких гипоталамических ядер. C-Fos-позитивные

ВЛИЯНИЕ МАЗИ «ВЕРМИН» НА ФАГОЦИТАРНУЮ АКТИВНОСТЬ НЕЙТРОФИЛОВ В РАНЕ ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ХИРУРГИЧЕСКОЙ ИНФЕКЦИИ У КРЫС WISTAR (N=5 В КАЖДОЙ ГРУППЕ)

Группа животных	Процент фагоцитоза			Фагоцитарное число			Дегенеративные формы		
	1-е сутки	3-и сутки	7-е сутки	1-е сутки	3-и сутки	7-е сутки	1-е сутки	3-и сутки	7-е сутки
Контроль	79,2±4,2	46,2$^{\#}$±2,5	40,7$^{\#}$±5,1	2,36±0,35	1,1$^{\#}$±0,09	0,98$^{\#}$ ±0,15	7,0±3,74	21,7$^{\#}$ ±5,35	32,5$^{\#}$ ±5,27
Мазь «Вермин» Состав 1	89,5±2,5	82,5*±4,8	60,0$^{\#}$ ±12,0	2,15±0,14	1,89* ±0,21	0,97$^{\#}$ ±0,16	8,0±1,95	10,7±4,47	25,6$^{\#}$ ±5,92
Мазь «Вермин» Состав 2	88±2	75,7*±5,7	74,3*±6,8	2,06±0,13	1,93* ±0,34	1,36$^{\#}$* ±0,09	4,75±2,17	14±7,56	16,6$^{\#}$* ±3,28

Примечание. * - $p<0,05$ по t-критерию Стьюдента в опытной группе относительно контрольной группы,
$^{\#}$ - $p<0,05$ по *t*-критерию Стьюдента в контрольной и опытной группе на 3-и и 7-е сутки по сравнению с 1-ми сутками

клетки распределяли по классам согласно их оптической плотности. Статистическую обработку результатов проводили с помощью программы Microsoft Excel.

Результаты. Проанализирована степень активации клеток гипоталамических структур на срезах 25, 28 и 30 уровней согласно атласу Swanson's: паравентрикулярного ядра (PVH-25); переднего гипоталамического ядра (AHN-25); латеральной гипоталамической области (LHA-25, LHA-28); дорзо-медиального ядра (DMH-28); вентро-медиального ядра (VMH-28); заднего гипоталамического поля (PH-30). Введение антигенов, ЛПС и БСА, приводило к увеличению числа активированных нейронов во всех исследуемых структурах гипоталамуса по сравнению с их количеством у интактных и контрольных животных. Инъекция ЛПС вызывала более высокую степень активации в LHA-28 и PVH-25, по сравнению с БСА, в остальных исследованных структурах наблюдалась лишь тенденция к более выраженной активации. Определение ОК позволило выявить, что более высокая степень активации при введении ЛПС характерна для AHN-25, PVH-25, LHA-28 и PH-30. После введения БСА статистически достоверных различий в активации между гипоталамическими структурами выявлено не было. Анализ исследуемых структур по ООП показал, что введение БСА приводит к увеличению средней оптической плотности c-Fos-позитивных клеток в VMH-28, LHA-28 и PH-30. В других исследованных структурах при введении БСА, как и после введения ЛПС, показатель ООП не отличался от контроля.

Заключение. Проведенное исследование показало, что через 2 часа после введения различных по своей природе антигенов (ЛПС и БСА) во всех исследованных структурах наблюдается изменение уровня экспрессии белка c-Fos в клетках, однако характер этого изменения различен. С одной стороны, реакция на ЛПС характеризуется активацией большего числа нейронов, при этом был отмечен разный по выраженности характер ответа исследованных гипоталамических структур. В то же время, введение БСА инициирует активацию меньшего количества клеток, но содержание в них белка c-Fos более высокое, что проявляется в повышенной оптической плотности клеток. Таким образом, в первые часы после введения антигенов разной природы (тимусзависимого и тимуснезависимого), наблюдается активация определенных гипоталамических структур, паттерн которой различен для каждого антигена.

ХАРАКТЕРИСТИКА АНТИГЕННЫХ ДЕТЕРМИНАНТ ТИРЕОГЛОБУЛИНОВ ПОЗВОНОЧНЫХ ЖИВОТНЫХ ПРИ ПОМОЩИ МОНОКЛОНАЛЬНЫХ АНТИТЕЛ

Пиневич А.А., Руденко И.Я., Шашкова О.А., Климович В.Б.

ФГУ Центральный научно-исследовательский рентгено-радиологический институт РОСЗДРАВА, Санкт-Петербург, Россия

Тиреоглобулин (ТГ) – высококонсервативный гликопротеин, предшественник тиреоидных гормонов. Показано, что на молекуле ТГ имеются как эволюционно консервативные эпитопы, общие для разных видов животных, так и видоспецифические антигенные детерминанты. Моноклональные антитела (МКАТ) распознают отдельные эпитопы на молекуле антигена, следовательно, они могут быть использованы для изучения полиморфизма молекулы ТГ.

Цель работы состояла в характеристике антигенных детерминант ТГ позвоночных животных при помощи панели из 54 МКАТ против ТГ человека и мыши, полученной в лаборатории. Были поставлены следующие задачи: (I) изучить экспрессию эпитопов, распознаваемых МКАТ, на ТГ разных видов животных; (II) изучить свойства эпитопов.

Исследование проводили на препаратах ТГ человека, быка, свиньи, крысы и курицы, а также на образцах ткани щитовидных желез собаки, кошки, кролика, мыши, голубя и лягушки. Экспрессию эпитопов, распознаваемых МКАТ, на ТГ различных видов животных, изучали путем непрямого иммуноферментного анализа (ИФА) с препаратами ТГ и иммуногистохимическими методами на срезах ткани щитовидных желез. Эпитопную специфичность МКАТ определяли методом конкурентного ИФА на препарате ТГ человека. В ходе исследования конформационной зависимости эпитопов путем ИФА препараты ТГ различных видов животных обрабатывали дитиотреитолом или меркаптоэтанолом для восстановления дисульфидных связей, формирующих трехмерную структуру белка. Для исследования природы антигенных детерминант путем ИФА препарат ТГ человека обрабатывали периодатом калия, который модифицирует углеводную часть молекулы ТГ, не влияя на ее белковую часть.

С помощью МКАТ на молекуле ТГ идентифицированы 42 антигенные детерминанты. В результате изучения экспрессии эпитопов на ТГ различных видов животных показано, что среди них присутствуют (I) антигенные детерминанты, видоспецифические для ТГ человека, (II) эпитопы, мозаично представленные на ТГ различных видов животных, и (III) эпитопы, выявленные на ТГ всех исследованных видов животных. Показано, что все видоспецифические для ТГ человека антигенные детерминанты являются конформационно зависимыми, в то время как обе группы филогенетически консервативных эпитопов включают в себя как конформационно зависимые, так и линейные антигенные детерминанты. Исследована направленность МКАТ к белковым/углеводным частям молекулы ТГ. Установлено, что большинство эпитопов молекулы ТГ имеют белковую природу. Углеводзависимые или углеводные детерминанты молекулы ТГ главным образом относятся к эпитопам, мозаично представленным на ТГ млекопитающих.

Таким образом, консервативность молекулы ТГ распространяется не только на первичную аминокислотную последовательность белка, но и на некоторые конформационные структуры. На основании полученных результатов можно высказать предположение, что филогенетически консервативные антигенные детерминанты, выявленные на ТГ всех исследованных классов позвоночных животных различного эволюционного происхождения, ассоциированы со структурами, выполняющими ключевые функции молекулы ТГ.

Исследование выполнено при поддержке гранта РФФИ № 05-04-48862.

ОСОБЕННОСТИ ОЦЕНКИ КЛИНИКО-ИММУНОЛОГИЧЕСКИХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ ПРИ ПРИМЕНЕНИИ ИММУНОТРОПНОЙ ТЕРАПИИ

Плоскирева А.А., Кирилличева Г.Б.[1], Соловьева М.С.[1], Веткова Л.Г.[1], Горелов А.В., Тилелеева Е.В.

ФГУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора, г. Москва;

[1]ГУ НИИЭМ им. Н.Ф.Гамалеи РАМН, г. Москва

Применение в последнее время препаратов, обладающих иммунотропным действием, стало достаточно широ-

ким. В последнее время в литературе рядом авторов (Степина 1991; Коляда, 1996; Кирилличева, 2000) отмечается непостоянство иммуномодулирующего эффекта, связанное с тем, что характер воздействия препарата определяется не только его функцией, но и зависит от исходного состояния иммунной системы.

Целью настоящей работы являлось изучение влияния иммунотропных препаратов (иммуномодуляторов различной природы и происхождения, вакцинных препаратов и пробиотиков) на различные биохимические параметры, показатели иммунной и нейроэндокринной систем.

В работе были использованы мыши с генетически обусловленными четкими различиями в функциональных характеристиках иммунной и нейроэндокринной систем: мыши-самцы линий СВА, С57BL/6 и мышей-гибридов (СВАхС57BL/6) F1 массой 16-18 г в возрасте 3 месяцев, полученных из питомника «Столбовая».

Показано, что при применении всех иммуномодулирующих препаратов изменения различных показателей иммунной и нейроэндокринной систем находятся в обратной зависимости от уровня изучаемого показателя у интактных животных в момент исследования. Иммуномодуляторы вызывают «стягивание» исходно оппозитных значений анализируемого показателя в зону или к зоне средних значений, что сопровождается уплощением биологического ритма. Изменение биологического ритма на фоне применения иммуномодуляторов является неспецифическим механизмом и свидетельствует о напряженности адаптационных систем организма.

Однократные исследования, наиболее часто используемые в клинике, иногда создают ложное впечатление о нормализации исследуемых клинико-иммунологических показателей, не диагностируя дисбаланс адаптационных систем организма.

Нами разработан адаптационно-биоритмологический подход для изучения различных патологических процессов, основанный на определении клинико-иммунологических показателей в различные фазы биоритма изучаемого показателя. Данный метод позволяет дифференцировать и качественно оценить неспецифические и специфические компоненты в патогенезе патологического процесса, а также адаптивные возможности организма. Это дает возможность для разработки научнообоснованного индивидуального патогенетического лечения инфекционной патологии.

ПЕРСПЕКТИВЫ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ СРАВНИТЕЛЬНО-ИММУНОЛОГИЧЕСКОГО ПОДХОДА ДЛЯ АНАЛИЗА АКТУАЛЬНЫХ ПРОБЛЕМ ФУНДАМЕНТАЛЬНОЙ ИММУНОЛОГИИ

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

НИИ экспериментальной медицины РАМН, Санкт-Петербург, Россия

В середине 1980-х гг. однозначно было доказано наличие молекул иммуноглобулинового суперсемейства у всех позвоночных животных, подозревалось их наличие у всех вторичноротых животных. Что касается первичноротых животных, то их защитные реакции рассматривались вне связи с иммуноглобулиновым суперсемейством. Представления о механизмах защиты первичноротых опирались на механизмы врожденного иммунитета, в том числе наличие антибиотиков животного происхождения, роль фенолоксидазной системы, наличие опсонинов и фагоцитоз. Тем более что отрицательные результаты ранее были получены и при оценке наличия иммунологической памяти у первичноротых, равно как и способности к тонкому, прецизионному распознаванию чужеродных структур. Но в настоящее время молекулы иммуноглобулинового супермейства найдены у совершенно разных беспозвоночных: насекомых, моллюсков и даже губок, но загадки их иммунной системы оказались связаны отнюдь не только с иммуноглобулиновой природой рецепторов. Тем более, что до настоящего времени у беспозвоночных действительно не обнаружено механизмов реаражировки (соматической рекомбинации) иммуноглобулиновых генов, что как раз и является материальной основой высочайшей специфичности иммунного ответа позвоночных.

Анализ эффективности механизмов врожденного и приобретенного иммунитета приводит к парадоксальным выводам. Врожденный иммунитет основан на распознающих молекулах, закрепленных в геноме, реаранжировка которых не является необходимой, и отличается отсутствием клонального размножения вовлеченных в ответ однотипных клеток. При этом распознавание идет за счет высоко консервативных паттернов. Для врожденного иммунитета характерно принципиальное решение проблемы распознавания «свое» – «чужое». Эволюция привела к сохранению паттернов распознавания только «не-своего», аутоспецифичности были отбракованы. Реакции врожденного иммунитета отличает и немедленная активация клеток-эффекторов.

Что касается приобретенного иммунитета, то его рецепторы кодируются как раз различными генетическими сегментами, для функционирования рецепторов необходима реаранжировка генов. Клонально-селекционная теория Ф.-М. Бернета с 1959 г. является одним из краеугольных камней современной иммунологии. Распознавание антигена идет не за счет паттернов распознавания, т.е. наборов консервативных и чужеродных структур, а за счет наличия в молекулах белков, углеводов и т.д. уникальных молекулярных группировок, формирующих антигенные детерминанты. При этом распознаются как «свои», так и «не-свои» антигены, поэтому проблема предотвращения аутоиммунной реакции, разрушительного ответа на аутоантигены, является очень актуальной именно для системы приобретенного иммунитета и решается в ходе дифференцировки каждой иммунокомпетентной клетки. Если врожденный иммунитет отличает немедленный ответ клеток-эффекторов, то для приобретенного иммунитета свойственен отложенный ответ, гораздо более поздний по сравнению с врожденным иммунитетом.

Однако целями любой защитной реакции, развивающейся через механизмы как врожденного, так и приобретенного иммунитета, являются блокада проникновения патогена; его иммобилизация; ограничение и полная блокада его размножения; уничтожение патогена; элиминация патогена; изоляция патогена, если уничтожение и элиминация были неэффективными. Все эти цели достигаются за счет эффекторных механизмов врожденного, но не приобретенного иммунитета, что позволяет ставить вопрос о функциях приобретенного иммунитета в целом.

Возможности сравнительно-иммунологического подхода хорошо видны на примере анализа структуры и функции такого важного органа иммунной системы, как тимус, на его эмбриогенез и характер дифференцировки клеток, равно как на биологический смысл процессов возрастной инволюции и акцидентальной трансформации.

Работа поддержана грантами РФФИ № 04-04-49069 и 04-04-49342.

ТУЧНЫЕ КЛЕТКИ КАК МИШЕНЬ ПРОТИВОВОСПАЛИТЕЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ ПЕНТРАКСИНОВ

Пронина А.П., Назаров П.Г.

Институт экспериментальной медицины РАМН, Санкт-Петербург, Россия

Тучные клетки (ТК) – долгоживущие клетки соединительной ткани, содержащие гранулы с гистамином, гепарином и протеолитическими ферментами, и играющие важную роль в механизмах аллергии и анафилаксии, где выделяемые ими биологически активные вещества являются основными эффекторными молекулами аллергической реакции. Вместе с тем, показана протективная роль ТК в защите от патогенов, заживлении ран, других гомеостатических процессах. Устойчивая персистенция в эволюции, от насекомых и рыб до человека свидетельствует о важной роли ТК. У мышей с отсутствием ТК эффективность врожденного иммунитета снижена [Malaviya et al., 1996; Echtenacher, Mdnnel, 1996].

Активность ТК регулируется многими рецепторами. Важнейшими являются высокоаффинный рецептор FcεRI и низкоаффинный рецептор FcγR, через которые ТК активируются иммунными комплексами, содержащими антиген и антитела классов IgE или IgG. В активации ТК посредством FcεRI-сигнала участвуют продукты активных форм кислорода и фосфолипаза С. ТК содержат преформированные медиаторы – гистамин, протеазы и готовый, быстро мобилизуемый TNFα, а после активации быстро синтезируют дополнительные сигнальные молекулы – простагландины, лейкотриены, другие цитокины (IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-13, IL-14, NGF), хемокины (MIP-1α, MCP-1, лимфотактин), серотонин, дофамин, и снова TNFα. Вторая волна ответа следует за немедленной реакцией гиперчувствительности и усиливает ее. Она влияет на последующие события, такие как формирование Th2 клеток и развертывание адаптивного иммунного ответа. Активированные ТК подают сигнал сосудистой системе с помошью вазоактивного гистамина и метаболитов арахидоновой кислоты, моноцитам и лимфоцитам – через хемотактические факторы, соединительной ткани – через протеазы, нейрональным элементам – через серотонин, дофамин, NGF. Триптаза ТК активирует PAR-рецепторы клеток эндотелия, запуская в них синтез IL-8 и других провоспалительных цитокинов [Lu, Zhao et al., 2005].

Fc-рецепторы для IgE (FcεRI) имеют необычайно высокий аффинитет (10^{-10} M), благодаря чему ТК ведут себя подобно клеткам адаптивной иммунной системы. На ТК есть 3 низкоаффинных рецептора для IgG: FcγRIIb1 – для IgG1, FcγRIIb2 – для IgG2a, FcγRIII – для IgG2b. Их сшивка также вызывает выброс содержимого секреторных гранул. Через FcγRIII активируется выброс серотонина, LTC4 и TNFα. Они отвечают на иммунные комплексы и за реакцию Артюса.

Находящиеся на ТК рецепторы FcγRIIb1 и FcγRIIb2 и мембранные молекулы родственного семейства gp49 – ингибиторные рецепторы [Castells et al., 1994; Huff et al., 1995]. Сигналы от FcγRIIb1 и FcγRIIb2 ингибируют активность ТК. Эти рецепторы ограничивают активность ТК, если FcγRII-рецепторы контактируют и сшиваются с рецепторами FcεRI. Активация ТК через рецепторы FcεRI снижается при одновременной активации тем же стимулом низкоаффинных рецепторов FcγRII или gp49. Это наблюдается при иммунотерапии, когда антиген (аллерген) агрегируется IgG-антителами, имеющимися у иммунизированного пациента [Castells, 1999]. Ингибирующий эффект этих рецепторов зависит от внутриклеточной последовательности ITIM, содержащейся не только у рецепторов FcγRIIb1 и FcγRIIb2, но и у таких рецепторов, как KIR на NK и CTLA-4 на Т-лимфоцитах [Scharenberg et al., 1996; Katz et al., 1997]. При этом ингибируется как выброс преформированных медиаторов, так и генерация липидных молекул *de novo* [Daeron et al., 1995; Katz, 1996].

Активация через FcεRI или FcγRII повышает устойчивость ТК к Fas- и TRAIL-индуцируемому апоптозу [Yoshikawa et al., 2000; Berent-Maoz et al., 2006].

Описаны эффекты ацетилхолина на ТК, подтипы участвующих рецепторов и пути передачи сигнала [Racke et al., 2004]. Стресс и ацетилхолин активируют ТК, вызывая их дегрануляцию [Umarova et al., 2003; Stander et al., 2003], причем на фоне действия провоспалительных цитокинов (LIF, TNF) ответ ТК на ацетилхолин возрастает [Fayon et al., 2006].

Пентраксины – класс древних сывороточных и клеточных молекул, участвующих в реакциях врожденного иммунитета у млекопитающих и человека. Наиболее известны С-реактивный белок (CRP) и сывороточный Р-компонент амилоида (SAP) – являющиеся маркерами острой фазы воспаления. Как защитные факторы, они связывают микробные вещества, нейтрализуют бактериальные токсины, активируют комплемент и являются опсонинами. CRP и SAP связываются с FcγR нейтрофилов, лимфоцитов, макрофагов, влияя на их функциональную активность: стимулируют митогенез лимфоцитов, активируют продукцию активных форм кислорода в нейтрофилах, усиливают фагоцитоз. Благодаря сродству к фосфорилхолину и подобным веществам, CRP выступает как ингибитор фосфолипаз неконкурентного типа и инактивирует ацетилхолин [Бутюгов А.А., 1998; Назаров П.Г., 1997, 2001, 2005]. Показано также, что введение CRP лабораторным животным подавляет развитие сенсибилизации к антигену и снижает проявления анафилаксии при повторном контакте с антигеном [Нежинская Г.И., Назаров П.Г., 2004, 2005]. Противоаллергические, антианафилактические эффекты CRP могут быть связаны с ингибирующим влиянием на функции ТК несколькими путями: через FcgR – за счет активации ITIM-мотива, через холинергический путь – за счет инактивации ацетилхолина и ограничения его возбуждающего действия, через блокирование фосфолипаз.

Поддержано грантом РФФИ 06-04-49629-а.

ВЛИЯНИЕ УРОВНЯ ЭКСПРЕССИИ CCL20 И НЕКОТОРЫХ ДРУГИХ ХЕМОКИНОВ НА ХАРАКТЕР ВОСПАЛЕНИЯ ПРИ ТУБЕРКУЛЕЗНОЙ ИНФЕКЦИИ

Радаева Т.В., Сосунов В.В., Евстифеев В.В., Апт А.С.

Центральный научно-исследовательский институт туберкулеза РАМН, Москва, Россия

CCL20 (MIP-3α) – недавно открытый хемокин, принимающий участие в регуляции иммунитета в эпителиальной ткани различной локализации при воспалении. Основным источником CCL20 в легких и бронхах считают альвеолоциты II типа. Кроме того, показано, что нейтрофилы, контактировавшие с патогеном либо взаимодействовавшие с TNF-α, также могут продуцировать CCL-20. Основными мишенями этого хемокина являются незрелые дендритные клетки, В-клетки и Т-клетки памяти, несущие специфический рецептор CCR6. Под влиянием CCL20 происходит интегрин-зависимая адгезия и миграция

клеток в фокусы воспаления. Показано, что TNF-α и IL-17 повышают продукцию CCL20. Вместе с этим, TNF-α и IL-17, действуя синергично, повышают уровень экспрессии MIP-2 - основного хемоаттрактанта нейтрофилов в воздухоносных путях мышей.

В нашей лаборатории изучается экспериментальный туберкулез на различных мышиных моделях. Одним из наиболее перспективных направлений исследований является изучение оппозитных по чувствительности к туберкулезу линий мышей. Сверхчувствительные мыши линии I/St отличаются от резистентных мышей линии A/Sn по ряду показателей, таких как выживание после инфицирования, высеваемость микобактерий из органов, функциональная активность легочных макрофагов. Существенно различается гистопатологическая картина легких у животных разных линий при развитии туберкулезного процесса. Так, у мышей линии I/St отмечается выраженное нейтрофильное воспаление, с крупными фокусами, часто содержащими зоны распада. У мышей линии A/Sn наблюдается более благоприятное макрофагальное воспаление, без образования сливных инфильтратов и зон распада.

При анализе экспрессии генов в целом легком мышей этих линий мы выявили межлинейные отличия в экспрессии генов CCL20 (в 4 раза) и его рецептора CCR6 (в 2 раза). Через неделю после инфицирования животных *M.tuberculosis* H37Rv экспрессия гена CCL20 возрастает в 8-10 раз у I/St и не снижается по крайней мере до 3 недели после заражения. У мышей A/Sn экспрессия данного гена остается неизменной по сравнению с интактными животными и не меняется в ходе развития инфекции. Экспрессия гена рецептора CCR6 возрастает у мышей обеих линий в 5-6 раз уже через 1 неделю после инфицирования и снижается до исходного уровня при развитии инфекции.

Кроме указанных генов нами был определен уровень экспрессии ряда других цитокинов и хемокинов. На основании полученных данных нами предлагается возможный механизм влияния уровня экспрессии определенных хемокинов и цитокинов на особенности воспаления при развитии туберкулеза у мышей, оппозитных по чувствительности к инфекции.

МОДИФИКАЦИЯ КЛЕТОЧНОЙ МЕМБРАНЫ АПОПТОТИЧЕСКИХ ТЕЛЕЦ ПРИВОДИТ К ИЗМЕНЕНИЮ ГАЛЕКТИН-ЗАВИСИМОГО ФАГОЦИТОЗА

Рапопорт Е.М., Моисеева Е.В., Чаадаева А.Ю., Корчагина Е.Ю., Бовин Н.В.

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

Введение. Активация макрофагов может происходить путем стимуляции цитотоксической и фагоцитирующей функции макрофагов, углевод-белковое узнавание играет при этом не последнюю роль. Макрофагальные С-лектины и сиглеки-1, -5 задействованы в лектин-опосредованном фагоцитозе. Информация об участии галектинов в лектин-зависимом фагоцитозе ограничена, хотя на макрофагах экспрессируются галектины-1, -3 и -4. Ранее нами было показано, что $T_{\beta\beta}$-дисахарид, входящий в состав олигосахаридных цепей гликолипидов и гликопротеинов апоптотических телец (АпТ), участвует в лектинзависимом фагоцитозе. Не исключено, что создание дополнительных сайтов связывания для макрофагальных галектинов может привести к активации фагоцитоза.

Целью данной работы было: 1) идентификация галектинов, участвующих в лектин-опосредованном фагоцитозе; 2) изучение действия АпТ, нагруженных гликолипидами – лигандами галектинов, на фагоцитоз макрофагов *in vitro*; 3) тестирование *in vivo* терапевтического воздействия АпТ, нагруженных лигандами галектинов.

Методы. Перитонеальные макрофаги получены из асцита мышей BYRB с перевитым лейкозом. Конденсацией аминопропилгликозидов с производными ди-олеоил-фосфатидилэтаноламина синтезированы гликолипиды Galβ1-3GalNAcβ ($T_{\beta\beta}$-OR) и Neu5Acα2-3Galβ1-4Glc (32SiaLac-OR). Встраивание неогликолипидов оценивали с помощью соответствующих антител цитофлуориметрией. Цитотоксическую активность макрофагов *in vitro* оценивали по уменьшению щелочной фосфатазной активности опухолевых клеток. В экспериментах *in vivo* терапия АпТ проводилась на 8-й день после инокуляции опухолевых клеток в течение месяца каждые 7 дней. Еженедельно измеряли рост опухоли и выживание мышей.

Результаты. 1) Макрофагальные галектины-1 и -4 участвуют в фагоцитозе, связываясь с Galβ1-3GalNAcβ/α фрагментом гликанов АпТ. 2) Модификация АпТ неогликолипидом $T_{\beta\beta}$-OR приводит к активации фагоцитоза *in vitro*. 3) АпТ, нагруженные $T_{\beta\beta}$-OR, были введены BYRB мышам с перевитым лейкозом, контрольным животным вводили интактные АпТ и АпТ, нагруженные 32 SiaLac-OR. В группе животных, получивших инъекции АпТ-$T_{\beta\beta}$, наблюдалась тенденция к замедлению роста опухоли и улучшение выживаемости мышей (таблица).

Заключение. Изменение углеводного паттерна АпТ может стать одним из способов модулирования активности макрофагов. Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ, грант № 04-04-49689.

СРАВНИТЕЛЬНОЕ ИЗУЧЕНИЕ КЛЕТОЧНОГО ИММУННОГО ОТВЕТА НА ЖИВОЙ И ИНАКТИВИРОВАННЫЙ РЕАССОРТАНТНЫЙ ШТАММ ВИРУСА ПТИЧЬЕГО ГРИППА H5

Рекстин А.Р.[1], Дешева Ю.А.[1], Лу Х.[2], Кац Д.М.[2], Климов А.И.[2], Руденко Л.Г.[1]

[1] Отдел вирусологии, НИИ экспериментальной медицины РАМН, Санкт-Петербург, Россия;

[2] Центры по контролю и предупреждению заболеваний, Атланта, США

Постоянно регистрируемые в последние годы случаи заражения и тяжелого заболевания людей вирусами гриппа птиц подтипа H5N1 продолжают вызывать серьезное беспокойство в связи с угрозой пандемии. Создание наиболее эффективных средств активной иммунопрофилактики гриппа является одним из приоритетов Всемирной Организации Здравоохранения. Поэтому вакцинные пре-

Группа животных	Прирост опухоли, % на день				Выживаемость мышей на 30-й день, %
	8	14	20	26	
Интактные АпТ	4,2	4,6	5	11,6	50
АпТ-3'SiaLac-OR	3,6	5,9	5,3	14,1	50
АпТ-$T_{\beta\beta}$-OR	2,9	4,3	5,2	10,4	75

параты, обладающие наибольшей широтой действия, то есть формирующие перекрестный иммунитет, крайне необходимы.

Целью настоящего исследования явилось изучение в эксперименте у мышей перекрестной защиты и клеточного иммунного ответа, формируемого после иммунизации холодоадаптированными реассортантными и донорскими вакцинными штаммами к гетерологичным вирусным антигенам.

Материалы и методы. В экспериментах использовали самок мышей линии Balb/c. Животных иммунизировали однократно под легкой анестезией: живой гриппозной реассортантной вакциной (ЖГВ) А/17/утка/Потсдам/86/92 (H5N2), приготовленной с использованием донора аттенуации А/Ленинград/134/17/57 (H2N2), интраназально, инактивированной гриппозной вакциной, приготовленной из того же штамма, внутримышечно. Спленоциты мышей получали спустя шесть недель после иммунизации и стимулировали *in vitro* либо 5 ГАЕ инактивированного формалином А/Гонконг/213/2003 (ГК/213), либо 250 нг рекомбинантного гемагглютинина (rHA) А/Гонконг/156/97 (ГК/156). Концентрацию цитокинов IL-2, IL-4, IFN-γ, IL-10 определяли в культурах супернатантов с помощью тест-систем Bio-Plex. Эффективность препаратов определяли после экспериментального заражения мышей 200 $ЛД_{50}$ высокопатогенного (ВП) вируса А/Вьетнам//1203/2004 (H5N1) (ВМ/1203).

Результаты. Стимуляция иммунных клеток инактивированным цельновирионным антигеном *in vitro* индуцировала более сильный ответ цитокинов по сравнению со стимуляцией рекомбинантным rHA H5. Спленоциты мышей, иммунизированных интраназально ВП H5N1 вирусом ГК/213, выбранным в качестве положительного контроля, продуцировали как Th1 (IFN-γ), так и Th2 (IL-4 и IL-10) цитокины. По сравнению с ЖГВ, ИГВ индуцировала более высокие уровни IL-4 и IL-10 в ответ на стимуляцию вирусом H5N1. Напротив, у животных, получивших ЖГВ уровень IFN-γ, продуцируемого спленоцитами после рестимуляции, был существенно выше, чем в группе, получившей ИГВ. Прививка ИГВ и ЖГВ формировала сопоставимые уровни IL-2, продуцируемого лимфоцитами после рестимуляции. Интересно, что спленоциты мышей, получивших в виде ЖГВ H2N2 вирус также отвечали на стимуляцию вирусом H5, что подразумевает наличие гетеросубтипического клеточного иммунного ответа к консервативным эпитопам внутренних белков вируса гриппа А.

Несмотря на то, что иммунизация ЖГВ и ИГВ H5N2 в высокой дозе обеспечивала полную защиту в отношении ВП вируса H5, антигенно и генетически отличного от вакцинных штаммов, однократная прививка ИГВ, в отличие от ЖГВ, полностью не предотвращала репродукцию ВП вируса в легких, мозге и носовых ходах. Примечательно также, что животные, получившие ЖГВ, содержащую вирус другого подтипа – А/Ленинград/134/17/57 (H2N2), несмотря на потерю веса и репродукцию ВП H5 вируса в легких, были защищены от смертности на 80%. Контрольные животные погибали в 100% случаев к 9 суткам после заражения с выраженной вирусемией.

Таким образом, можно предположить, что перекрестная защита в случае ИГВ была опосредована в основном стимуляцией перекрестно-реагирующих вирус-специфических Th2-лимфоцитов, а в случае ЖГВ – стимуляцией перекрестно-реагирующих вирус-специфических Th1 и $CD8^+$ лимфоцитов. При этом прививка ЖГВ обеспечивала не только полную защиту, но и предотвращала репродукцию вируса в верхних и нижних дыхательных путях, а следовательно, и передачу гетерологичного ВП вируса гриппа.

ИСПЫТАНИЯ ИММУНОМОДУЛЯТОРОВ В СИСТЕМЕ *IN VITRO*

Рябичева Т.Г, Вараксин Н.А., Тимофеева Н.В., Ким И.И.[1], Нечаева Е.А.[1]

ЗАО «Вектор-Бест», Кольцово, Новосибирская обл., Россия

[1]ФГУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора

В связи с все возрастающим количеством очагов обнаружения случаев птичьего гриппа среди диких перелетных птиц возникла необходимость защиты домашних птиц от инфекции. Причем, перелетные птицы являются резервуаром вируса, но болеют в основном их домашние сородичи, от которых в свою очередь, в ряде стран заражаются, болеют и умирают люди. Птицы болели гриппом и раньше, только в последнее время падеж птичьего поголовья приобретает характер эпидемии, что, скорее всего, обусловлено снижением противовирусного иммунитета вследствие включения в рацион домашних птиц больших доз антибиотиков в течение уже достаточно длительного времени. Поэтому даже поголовная вакцинация против штамма H5N1 не сможет эффективно защитить птиц от падежа, вызванного другими штаммами гриппа или иными вирусными инфекциями. Необходимо усилить иммунную систему заменой антибиотиков на пробиотики или иммуномодуляторы.

Разработка новых высокоэффективных и в тоже время недорогих иммуномодуляторов для ветеринарии подразумевает оптимизацию по многим параметрам, таким как: исходное сырье, способ извлечения комплекса действующих веществ, дизайн готовой формы препарата и другим. Простая, надежная и, самое главное, быстрая модель испытания иммуномодуляторов *in vitro* позволит провести все эти испытания и выбрать наиболее эффективные варианты препаратов в максимально короткие сроки.

Цель данной работы – отработка модели испытания иммуномодуляторов в системе *in vitro.*

Материалы и методы: Для изучения влияния препаратов на клетки крови человека у здоровых доноров утром натощак брали кровь из локтевой вены в пробирки с гепарином натрия. Цельную кровь разводили в 5 раз средой DMEM M производства ФГУН ГНЦ ВБ «Вектор» с добавлением определенного количества исследуемого препарата. Образцы инкубировали при 37°С в течение 3-48 ч. Для анализа цитокинов использовали наборы для иммуноферментного анализа производства ЗАО «Вектор-Бест» (Кольцово, Новосибирская обл.).

В качестве скрининговой модели испытания перспективных претендентов использовали изменение продукции цитокинов клетками цельной крови под воздействием исследуемого препарата. Количественным параметром служит соотношение концентрации цитокина в пробе с препаратом к концентрации цитокина в пробе без препарата, т.е. отношение индуцированной продукции цитокинов к спонтанной продукции (так называемый индекс стимуляции). В качестве положительного контроля использовали такие известные иммуномодуляторы как Полиоксидоний (производство фирмы «Иммафарма») и Иммунал (производство фирмы «Lek»). Для этих и испытуемых препара-

ИНДЕКС СТИМУЛЯЦИИ ПРИ ИНКУБАЦИИ В ТЕЧЕНИЕ 48 ЧАСОВ ДЛЯ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ И КОММЕРЧЕСКИХ ПРЕПАРАТОВ

	С, мкг/мл	IL-4	TNFα	IFNγ	IL-1β	IL-1RA	IL-6	IL-8	ИП
Полиоксидоний	1000	1,23	1,87	8,17	9,37	1,44	1,67	0,90	0,87
Иммунал	1000	1,00	2,56	0,20	3,01	1,06	2,78	3,12	1,37
Препарат №1	100	1,66	3,09	2,22	3,21	1,13	1,97	2,36	0,70
Препарат №2	100	1,80	8,32	1,41	3,40	0,99	2,95	3,01	0,73
Препарат №3	100	1,52	7,99	1,61	2,64	0,99	1,93	2,39	0,87
Препарат №4	1000	1,61	15,09	2,22	9,33	0,53	1,67	1,43	0,60
Препарат №4	100	1,52	9,68	2,82	8,66	0,88	2,06	1,74	0,73
Препарат №5	1000	1,61	17,72	1,01	2,37	1,01	2,94	2,55	0,80
Препарат №6	10	1,66	1,59	1,41	1,03	1,14	1,53	1,54	0,73
ФГА	10	3,81	32,89	536,86	1,14	1,25	1,02	2,66	1,20

тов исследовали зависимость индекса стимуляции от концентрации препаратов в диапазоне (1-6000) мкг/мл. О токсичности препарата судили по индексу пролиферации. В таблице приведены данные для некоторых препаратов в оптимальной концентрации, для сравнения приведены значения для фитогемагглютинина (ФГА). Из таблицы видны существенные различия в стимулирующем действии как коммерческих, так и экспериментальных препаратов, что позволяет еще на этапе предварительной проработки сконцентрировать усилия в нужном направлении.

Таким образом, применение предложенной модели испытания препаратов в системе *in vitro* с использованием доступных наборов для иммуноферментного анализа отечественного производства позволяет достаточно быстро и эффективно проводить отбор препаратов с необходимым иммуностимулирующим действием.

ВЛИЯНИЕ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК НА РАЗВИТИЕ ИММУННОГО ОТВЕТА В СМЕШАННОЙ КУЛЬТУРЕ ЛИМФОЦИТОВ

Рябцева Е.С., Левин В.И., Луц Л.С.

Республиканский научно-практический центр гематологии и трансфузиологии, Минск, Беларусь

Введение. По данным литературы, мезенхимальные стволовые клетки (МСК) обладают иммуносупрессивными свойствами. Однако механизмы их действия до конца еще не изучены.

Цель и задачи. Целью работы было изучение иммуносупрессивного влияния МСК на совместно культивируемые мононуклеары двух здоровых доноров, не совместимых по антигенам HLA I класса с помощью метода аналитического микроэлектрофореза.

Материалы и методы. Мононуклеары доноров сепарировались по стандартной методике на градиенте плотности фиколл-верографин. МСК выделялись из липоаспирата, полученного при проведении операций липосакции и обработанного коллагеназой I типа («Sigma», Германия), и культивировались в специализированной среде для выращивания мезенхимальных клеток MesenCult (StemCell Technologies, Канада). Электрофоретическая подвижность (ЭФП) лимфоцитов определялась с помощью цитоферометра фирмы «Opton», Германия.

Результаты. Было показано, что уровень ЭФП смеси лимфоцитов двух здоровых доноров, не совместимых по антигенам HLA I класса (0,97±0,2 мкм $с^{-1}В^{-1}$см), в течение первого часа инкубации повышается и достигает 1,02±0,2 мкм $с^{-1}В^{-1}$см ($p<0,05$). Добавление в культивационную среду цитостатического препарата циклоспорина блокирует первую фазу распознавания антигенных различий, что удерживает ЭФП смеси клеток на исходном уровне (0,98±0,2 мкм $с^{-1}В^{-1}$см). Такой же эффект наблюдается при добавлении к суспензии лимфоцитов МСК жировой ткани. При этом минимально необходимое для эффективной иммуносупрессии соотношение МСК: мононуклеары составляет 1:50.

Заключение. Исходя из полученных результатов, можно предположить, что дополнительное введение МСК при проведении трансплантации гемопоэтических клеток крови может быть использовано для снижения риска отторжения трансплантата и развития болезни «трансплантат против хозяина».

НОВЫЕ ДАННЫЕ ОБ УЧАСТИИ ПЕЧЕНИ В РЕГУЛЯЦИИ ЕСТЕСТВЕННОЙ ИММУНОРЕЗИСТЕНТНОСТИ

П.Н. Савилов

Медицинская академия, Воронеж, Россия

В опытах на 60 беспородных белых крысах (самках) массой 170-220 г исследовали артериальную кровь (АК), кровь воротной вены (КВВ) и кровь печёночных вен (КПВ) в норме и после лапаротомии. В сыворотке крови определяли активность лизоцима, β-лизинов, а также её бактерицидный индекс (БИС) по отношению к *E.coli* (штамм К-12). Кроме этого исследовали фагоцитарное число (ФЧ) и фагоцитарный индекс (ФИ) нейтрофилов и моноцитов к указанному микробу.

Как видно из полученных результатов (табл.), у интактных крыс при прохождении крови через печень происходит увеличение активности сывороточного лизоцима при одновременном ограничении активности β-лизинов, поступающих с кровью воротной вены. Достоверное снижение БИС к *E.coli*, выявленное при прохождении крови через интактную печень, сопровождалось увеличением ФЧ нейтрофилов и моноцитов к данному микробу, тогда как ФИ этих клеток к исследуемым микроорганизмам оставалась без изменения.

Лапаротомия не изменяла способность печени стимулировать фагоцитарную активность нейтрофилов и моноцитов по отношению к *E.coli*, но вызывала снижение БИС к *E.coli* в АК на 3-и, а в КВВ и КПВ на 7-е сутки послеоперационного периода соответственно на 26, 30 и 28%. При этом кратковременное (на 7-е сутки) снижение лизоцимобогащающей функции печени сопровождалось избирательным понижением (на 41%) активности β-лизинов в сыворотке КВВ, которое не отражалось на их активности в КПВ. Активность сывороточного лизоцима в АК и КВВ, равно как β-лизинов в АК и КПВ, после лапаротомии

Показатели интактных животных	Кровь		
	артериальная	воротной вены	печёночных вен
Лизоцим (у.е.)	1,56 ± 0,14*	1,44 ± 0,09*	2,85 ± 0,42
β-лизины (у.е.)	1,5 ± 0,12	2,09 ± 0,21*	1,42 ± 0,09
БИС (у.е.)	2,31 ± 0,2*	2,26 ± 0,19*	1,79 ± 0,12
ФЧ нейтрофилов (%)	33,3 ± 2,1*	31,3 ± 2,54*	50,0 ± 2,6
ФЧ моноцитов (%)	28,7 ±2 ,24*	30,3 ± 2,39*	40,0± 2,6
ФИ нейтрофилов	5,27 ± 0,25	5,64 ± 1,6	5,27 ± 0,3
ФИ моноцитов	3,19 ± 0,15	4,31 ± 0,43	3,64 ± 0,25

Примечание: *(p<0,05) – достоверность различий по сравнению с кровью печёночных вен.

оставалась в пределах нормы на протяжении 14-ти суток послеоперационного периода.

Из полученных результатов следует, что изменение интактной печенью активности внеклеточных лизоцима и β-лизинов, находящихся в крови, происходит независимо от влияния данного органа на её антиколибактериальную активность. Частично депонируя гуморальные факторы, определяющие бактерицидность сыворотки к *E. coli*, печень увеличивает в ней количество нейтрофилов и моноцитов, активно фагоцитирующих данный микроб, не изменяя при этом интенсивность его поглощения этими клетками. Наибольшей чувствительностью к нарушению целости брюшной полости (лапаротомия) обладает гуморальное звено антиколибактериальной защиты организма, что, вероятно, связано с уменьшением содержания в крови антиколибактериальных антител.

ВЛИЯНИЕ ПРЕПАРАТА "МИКРОСТИМ" НА ФАГОЦИТАРНУЮ АКТИВНОСТЬ НЕЙТРОФИЛОВ КРОВИ ЛЮДЕЙ *IN VITRO*

Сафонова Г.М., Чистохина Л.П., Несчисляев В.А.

Филиал ФГУП "НПО "Микроген" МЗ и СР РФ "Пермское НПО "Биомед", Пермь, Россия

В настоящее время большое внимание уделяется иммунотропной активности продуктов жизнедеятельности лактобактерий, так как они в норме присутствуют в организме здорового человека и необходимы для формирования и полноценного функционирования иммунной системы (Пинегин и др., 1995; Бондаренко и др., 1998; Петров и др., 2000). В Пермском НПО "Биомед" по оригинальной технологии получен препарат "Микростим", содержащий низкомолекулярные метаболиты лактобактерий штамма *Lactobacillus plantarum* 8Р-А3. Ранее проведенные нами исследования показали, что препарат обладает пробиотической и иммуномодулирующей активностью.

Целью работы явилось исследование влияния препарата "Микростим" на фагоцитарную активность нейтрофилов крови людей *in vitro*.

Материалы и методы. В ходе эксперимента исследовали кровь 12 практически здоровых людей добровольцев обоего пола в возрасте от 28 до 50 лет (средний возраст 36,3 года), не являющихся постоянными донорами. Проводили предварительную инкубацию цельной венозной крови с препаратом "Микростим" в концентрациях от 2 до 0,0002 мг/мл в течение 1 ч при 37°С. Для сравнения готовили пробу с блокатором фосфодиэстеразы – теофиллином ("Sigma") в конечной концентрации 600 мкг/мл, которую также инкубировали в течение 1 ч при 37°С (Шилов Ю.И., Атнагузина А.Т., 1997). Фагоцитарную активность нейтрофилов крови оценивали по модифицированному методу В.Н. Каплина (1996). В качестве объекта фагоцитоза использовали формалинизированные эритроциты барана. Полученные данные обработаны статистически и представлены в виде средней арифметической и ее средней ошибки (M±m). Достоверность различий между группами оценивали с помощью *t*-критерия Стьюдента.

Основные результаты. Важной особенностью иммуномодулирующего действия препарата является его стимулирующее влияние на фагоцитирующие клетки, которые играют большую роль в обеспечении естественной резистентности организма, а также в реализации иммунного ответа (Долгушин, Бухарин, 2001). Установлено, что "Микростим" в широком диапазоне концентраций повышает фагоцитарную активность нейтрофилов периферической крови людей *in vitro* (табл.). Такая высокая чувствительность к стимулирующему влиянию препарата, вероятно, связана с прямым воздействием метаболитов лактобактерий на *toll*-подобные рецепторы нейтрофилов (Medzhitov R., Janeway C., 2000). Помимо этого возможно опсонизирующее влияние присутствующих в крови практически всех здоровых людей антител к продуктам жизнедеятельности бактерий нормофлоры (Пинегин Б.В. и др.,

ВЛИЯНИЕ ПРЕПАРАТА "МИКРОСТИМ" НА ФАГОЦИТАРНУЮ АКТИВНОСТЬ НЕЙТРОФИЛОВ КРОВИ ЛЮДЕЙ *IN VITRO*

Экспериментальное воздействие	Процент фагоцитоза	Фагоцитарное число	Фагоцитарный индекс
Без преинкубации	41,17±2,35**	0,59±0,05*	1,42±0,05**
Преинкубация, контроль	53,00±2,85	0,81±0,08	1,67±0,07
Теофиллин, 3 мМ	34,92±3,51***	0,54±0,08*	1,50±0,06
	Микростим		
0,0002 мг/мл	58,67±3,20	1,11±0,07*	1,88±0,06*
0,002 мг/мл	68,83±2,44***	1,30±0,07***	1,91±0,07*
0,02 мг/мл	74,83±2,21***	1,47±0,07***	1,96±0,07**
0,2 мг/мл	70,42±2,42***	1,41±0,06***	1,99±0,07**
2 мг/мл	67,42±2,77**	1,40±0,06***	2,09±0,07***

Примечание. * - p<0,05; ** - p<0,01; *** - p<0,001 по *t*-критерию Стьюдента относительно пробы с преинкубацией.

1995). Следует отметить, что ни одна из использованных концентраций препарата, включая и максимально возможную (2 мг/мл), не оказала угнетающего влияния на фагоцитоз.

Заключение. Препарат "Микростим", содержащий метаболиты лактобактерий, повышает фагоцитарную активность нейтрофилов периферической крови людей. Данный эффект является еще одним проявлением иммуностимулирующего действия препарата.

ВЛИЯНИЕ РИБОМУНИЛА НА РЕПАРАТИВНЫЕ ПРОЦЕССЫ В КОЖЕ КРЫС

Селянина О.Н., Валамина И.Е., Тихонина Е.А., Клейн А.В., Береснева О.Ю, Макеев О.Г., Базарный В.В.

Уральская государственная медицинская академия

Морфофункциональное состояние кожи определяется сложным комплексом факторов, в том числе – и иммунологических, которые различными путями влияют на процессы клеточной пролиферации, дифференцировки и апоптоза. Поэтому оправданным представляется использование иммунотропных препаратов при нарушении процессов регенерации кожи, которые лежат в основе ряда патологических состояний. При этом практического решения требует вопрос о влиянии способа введения препарата (локальный, системный) на активность репарации, что и определило цель исследования. Для ее достижения изучали влияние внутрибрюшинного и внутрикожного введения рибомунила на заживление кожной раны.

Материалы и методы. Исследование проведено на крысах породы Вистар. Моделирование кожной раны (площадь которой составляла 1 кв.см.) осуществляли хирургическим способом на дорсальной поверхности крыс в условиях легкого эфирного наркоза с соблюдением правил антисептики.

Рибомунил вводили животным в двух вариантах – внутрибрюшинно (доза препарата составляла 0, 001 мг рибомунила, содержащего рибосомную фракцию *Klebsiella pneumonia, Streptococcus pneumonia, Streptococcus pyogenes, Haemophilus influenzae*) и внутрикожно (в дозах 0,001 и 0,0002 мг) с целью дифференциальной оценки локального и системного введения препарата. Во всех случая препарат вводили в течение 3 дней, начиная со дня операции, забой животных осуществляли на 7 сутки и 15 сутки.

Для уточнения механизма действия рибомунила его вносили в культуру фибробластов кожи кролика и затем оценивали интенсивность синтеза ДНК в клетках по включению ^{3}H-тимидина.

Регенерацию кожи контролировали по времени отхождения струпа и морфологической картине заживления раны, которую изучали с помощью стандартных гистологических, гистохимических (окраска по Хейлу, ШИК-реакция), компьютерной морфометрии кожного регенерата и электронно-микроскопических методик.

Для оценки состояния иммунной системы определяли содержание лимфоцитов в крови, селезенке и костном мозге. Метаболическую активность лимфоидных клеток селезенки оценивали по включению ^{3}H-тимидина в ДНК. Для оценки фагоцитов крови использовали комплекс цитохимических реакций. Для оценки острофазовой реакции в сыворотке определяли концентрацию С-реактивного белка, фибриногена, церулоплазмина, альбумина.

Результаты. В исследовании была выявлена двухфазная реакция иммунной системы при регенерации кожи. Первый пик (1-3 сутки) характеризует неспецифическую острую воспалительную реакцию в ответ на травму. Второй пик, наиболее выраженный к 7-10 суткам наблюдения, отражает участие иммунной системы в репаративном процессе.

При введении рибомунила степень реакции системы крови у животных зависела от способа введения препарата. Внутрибрюшинные инъекции вызвали заметную стимуляцию лимфопоэза и активацию иммунокомпетентных клеток. При введении максимальной дозы препарата внутрикожно эти изменения были не столь значительными, а внутрикожное введение минимальной дозы рибомунила (0,0002 мг) не вызвало заметных изменений в состоянии лимфоидных клеток и фагоцитов крови.

При гистологическом исследовании у контрольных животных на седьмые сутки были выражены признаки воспалительной реакции. В раневом дефекте присутствовала новообразованная грануляционная ткань и разрозненные волокна коллагена. При введении рибомунила установлено более выраженное созревание грануляционной ткани. В препаратах встречались кератиноциты, коллагеновые волокна. В 50 % случаев в этот срок выявлено наползание на грануляционную ткань новообразованного эпителия, в то время как в контрольной группе животных случаев эпителизации раневого дефекта в этот срок не обнаружено.

Анализ дальнейшей динамики регенерации кожной раны в группах показал, что при введении рибомунила образуется более нежный соединительнотканный рубец, а репаративная регенерация эпителия протекает в более короткий срок. У крыс, получивших препарат внутрикожно, репаративные процессы были более выражены, при этом заметных дозозависимых различий мы не установили.

В условиях *in vitro* рибомунил стимулировал пролиферативную активность фибробластов (по синтезу ДНК) на 162%.

Таким образом, рибомунил наряду с неспецифической иммунотропной активностью проявляет способность стимулировать репаративные процессы в коже. Механизмы этого связаны как с непосредственным влиянием препарата на клетки кожи, так и, вероятно, с лимфоцит-опосредованными процессами (продукция интерлейкинов). Максимальный эффект выражен при его внутрикожном введении. Полученные данные расширяют наши представления о возможностях и механизмах местной иммунотерапии.

ВЛИЯНИЕ ЦИКЛОФОСФАНА И ЕГО КОМБИНАЦИИ С ПОЛИКОМПОНЕНТНОЙ ВАКЦИНОЙ "ИММУНОВАК-ВП4" НА ЭКСПРЕССИЮ ПОВЕРХНОСТНЫХ МАРКЕРОВ СПЛЕНОЦИТОВ МЫШЕЙ

Семенова И.Б.[1], Ахматова Н.К.[2], Киселевский М.В.[3], Титов К.С.[3], Доненко Ф.В.[3], Лосева Л.Ф.[3], Курбатова Е.А.[2]

[1]ГУ НИИ ЭМ им.Н.Ф.Гамалеи РАМН;

[2]ГУ НИИ вакцин и сывороток им. И.И.Мечникова РАМН;

[3]ГУ РОНЦ им. Н.Н.Блохина РАМН, Москва, Россия

В настоящее время применение цитостатиков в комплексном лечении онкологических заболеваний является неотъемлемым компонентом химиотерапии. Однако цитостатические препараты вызывают у пациентов иммуно-

РАЗНОНАПРАВЛЕННАЯ ЭКСПРЕССИЯ ПОВЕРХНОСТНЫХ МАРКЕРОВ НА СПЛЕНОЦИТАХ МЫШЕЙ, ПОЛУЧИВШИХ ЦИКЛОФОСФАН, "ИММУНОВАК-ВП-4" ИЛИ ИХ КОМБИНАЦИЮ

Введено	Уровни экспрессия поверхностных маркеров (%)													
	CD3	NK	CD3/NK	CD4	CD25	CD4/CD25	CD8	CD14	CD19	CD40	CD80	CD86	MHCI	MHCII
-	49,5 ±2,2	20,3 ±0,8	2,0 ±0,003	36,0 ±0,6	15,2 ±0,3	1,5±0,09	7,6 ±0,32	3,33 ±0,2	15,4 ±0,2	0,03 ±0,03	0	1,9 ±0,09	2,7 ±0,23	2,23 ±0,15
ЦФ	22,7 ±1,16*	20,3 ±0,62	1,04 ±0,02	14,4 ±0,67*	14,17 ±0,93	1,28±0,26	9,6 ±0,55	20,67 ±1,07**	1,2 ±0,11*	1,0 ±0,15**	6,0 ±0,12**	0,03 ±0,03*	2,2 ±0,09	1,57 ±0,15
ЦФ и ммунновак ВП-4	39,0 ±0,9	9,4 ±0,51*	2,0 ±0,15	36,4 ±0,8	14,8 ±0,75	2,1±0,32	13,3 ±0,96**	3,1 ±0,55	4,8 ±0,15*	0,2 ±0,06	7,4 ±0,53**	1,0 ±0,03*	1,47 ±0,003*	0,3 ±0,15*
Иммуновак ВП-4	27,7 ±1,14*	32,7± 1,21**	12,85 ±1,01**	28,57± 0,85*	12,7± 0,44	6,0±0,58**	6,2 ±0,44	6,53 ±0,15**	6,0 ±0,58*	0,6 ±0,06**	6,73 ±0,03**	0,37 ±0,12*	0,77 ±0,17*	0,23 ±0,03*

Примечание. Циклофосфан вводили внутрибрюшинно в дозе 100 мг/кг, Иммуновак-ВП-4 – подкожно в дозе 400 мкг/мышь. Препараты инокулировали одновременно.* - Уменьшение экспрессии маркера; ** - Увеличение экспрессии маркера

супрессию, что является нежелательным эффектом. Для восстановления измененной функции иммунной системы препаратами выбора являются иммуномодуляторы. Среди них как наиболее перспективные рассматриваются иммуномодуляторы микробного происхождения, т.к. они действуют прежде всего на систему врожденного иммунитета, инициация которой является первой линией защиты организма и дает начало иммунологическим процессам, лежащим в основе адаптивного иммунитета.

Целью исследований было изучить корригирующее действие иммуномодулятора -поликомпонентной бактериальной вакцины 'Иммуновак-ВП-4" при иммуносупрессии, вызванной цитостатиком циклофосфаном в эксперименте на молекулярно-клеточном уровне.

Основной задачей являлось определить и сопоставить экспрессию дифференцировочных и активационных маркеров, костимулирующих молекул и молекул антигенного представления на спленоцитах мышей, получивших циклофосфан, «Иммуновак-ВП-4» или их комбинацию.

Материалы и методы. Опыты проводили на мышах линии СВА. Через 24 часа после инъекций препаратов на спленоцитах мышей определяли на проточном цитометре экспрессию следующих поверхностных молекул: CD3, NK, CD4, CD25, CD8, CD14, CD19, CD40, CD80, CD86, MHCI, MHCII, а также одновременную экспрессию CD3 и NK или CD4 и CD25.

Результаты. Данные, представленные в таблице, показывают, что исследуемые препараты: цитостатик циклофосфан и иммуномодулятор микробного происхождения поликомпонентная вакцина Иммуновак ВП-4 в отдельности по-разному влияли на экспрессию поверхностных маркеров на спленоцитах мышей. Введение циклофосфана неиммунизированным животным угнетало экспрессию маркеров CD3, CD4, CD19, CD86, усиливало экспрессию маркеров CD14, CD40, CD80 и не влияло на % экспрессии NK, CD3/NK, CD25, CD4/CD25, CD8, MHCI, MHCII. Подкожное введение "Иммуновак-ВП-4" интактным мышам уменьшало экспрессию молекул CD3, CD4, CD19, CD86, MHCI, MHCII. Вакцина у интактных животных стимулировала экспрессию маркеров NK, CD3/NK,CD4/CD25, CD14, CD40 CD80 и не модулировала экспрессию молекул CD25, CD8. Установлено, что при комбинированном введении цитостатика и иммуномодулятора вектора активности этих препаратов не складываются по арифметическому принципу. Выявлено по крайней мере четыре варианта развития событий: 1) Взятые по отдельности иммуномодулятор и цитостатик уменьшают экспрессию маркеров CD3 и CD4; после совместного введения препаратов экспрессия названных молекул оставалась на уровне контроля; 2) Иммуномодулятор потенцировал появление маркеров NK, CD3/NK, CD4/CD25. Циклофосфан не влиял на указанный процесс. Комбинация указанных препаратов приводила к угнетению экспрессии маркеров NK или 3) не влияла на экспрессию CD3/NK и CD4/CD25 молекул; 4) При совместном введении иммуномодулятора и цитостатика уровень экспрессии молекул CD14 не изменялся по сравнению с контролем, в то время как и один иммуномодулятор, и только циклофосфан усиливают экспрессию этой молекулы.

Заключение. Таким образом, отдельное или сочетанное применение цитостатика и иммуномодулятора микробного происхождения приводит к разнонаправленному изменению поверхностных маркеров на спленоцитах мышей, получивших эти препараты. При определенных условиях "Иммуновак-ВП-4"отменяет супрессирующее действие цитостатика в отношении молекул CD3, CD4, CD40, CD86. Отмеченные изменения экспрессии поверхностных маркеров происходили на фоне однократного введения циклофосфана и при этом еще не установившейся иммуносупрессии.

ЗАВИСИМОСТЬ ЭФФЕКТИВНОСТИ ХИРУРГИЧЕСКОГО ЛЕЧЕНИЯ И ИММУНОТЕРАПИИ ОТ ОСОБЕННОСТЕЙ СУБКЛИНИЧЕСКОГО ПЕРИОДА РОСТА КАРЦИНОМЫ МОЛОЧНЫХ ЖЕЛЕЗ МЫШЕЙ

Семушина С.Г. [1], Чаадаева А.В.[1], Свирщевская Е.В.[1], Смирнова И.В.[1], Кесслер Ю. В.[1], Сапожников А.М.[1], Телфорд В.[2], Тан Ю.[3], Ден Оттер В.[3], Моисеева Е.В. [1]

[1]Институт биоорганической химии РАН, Москва, Россия;

[2] Национальный Институт Здоровья, Бетезда, США;

[3] Утрехтский Университет, Утрехт, Нидерланды

Введение. Рак молочной железы (РМЖ) как человека, так и мышей из нашей коллекции характеризуется крайне высокой индивидуальной вариабельностью. Известно, что иммунотерапия и хирургическое вмешательство не одинаково эффективны для пациентов с различиями в характере опухолевого роста и количестве/качестве лейкоцитарных инфильтратов опухолей (ЛИО). Поэтому в мышиных моделях мы выделяем лаг-позитивный (лаг$^+$) и лаг-негативный (лаг$^-$) РМЖ судя по наличию/отсутствию субклинического периода роста (времени от пальпируемого обнаружения опухоли до ее визуального проявления).

Целью данной работы было изучить различия между лаг$^+$ и лаг$^-$ РМЖ мышей по динамике опухолевого роста, патоморфологии и выживанию опухоленосителей и определить эффективность хирургического лечения и иммунотерапии самок с лаг$^+$ и лаг$^-$ опухолями.

Методы. У 200 самок мышей линий BLRB, BYRB и CBRB были обнаружены спонтанные аденокарциномы молочных желез. РМЖ были хирургически удалены у 35 самок по мере клинического проявления у них первичных опухолей. 23 самки с лаг$^+$ и лаг$^-$ РМЖ на различных стадиях прогрессии получили одновременно однократную локальную инъекцию IL-2 в дозе 2,5 x 10^6 МЕ. Наблюдали динамику роста первичных (I) и вторичных (II) РМЖ, а также выживание мышей в контрольных и экспериментальных группах. Патоморфологическое и цитофлуориметрическое исследование ЛИО проводили как посмертно, так и на операционном материале. Фенотип/композицию клеток ЛИО определяли, используя CD3, CD4, CD8, CD11b, CD19, CD25, F4/80 и NK1.1 антитела.

Результаты. Интактные самки с постепенно проявляющимися высокодифференцированными лаг$^+$ РМЖ в среднем выживали дольше, чем самки с внезапно проявляющимися низкодифференцированными лаг$^-$ карциномами. Лаг$^+$ опухоли характеризовались CD4/CD8 соотношением, сходным с нормальным показателем в интактной селезенке. А лаг$^-$ опухоли демонстрировали истощение CD4$^+$ с преобладанием CD8$^+$ лимфоцитов, усугубляющимся по мере прогрессии РМЖ, что приводило к выраженному дисбалансу CD4/CD8 в ЛИО. Время появления II-РМЖ после экстирпации I-РМЖ в среднем не отличалось от соответствующего показателя в контроле. Только 10% интактных опухоленосителей выживали дольше 18 недель. Однако после экстирпации I-РМЖ доля таких самок достигала 25-38% независимо от того, появились ли у них II-РМЖ или нет. При этом, только в этой группе были выявлены явные ЛИО с преобладанием Т-лимфоцитов и ЕК. Лечение IL-2 привело к угнетению опухолевого роста и увеличению продолжительности жизни только у самок с лаг$^-$ РМЖ.

Заключение. Наличие субклинического (лаг) периода опеделяет стратегию лечения РМЖ. Так, при хирургическом вмешательстве это определяет выбор оптимального времени экстирпации I-РМЖ. По нашим данным, иммунотерапия с помощью IL-2 лаг$^+$ карцином молочных желез не показана.

РОЛЬ МОНООКСИДА АЗОТА В МИГРАЦИИ ЗРЕЛЫХ Т-ЛИМФОЦИТОВ В ТИМУС КРЫС

Сергеев В.Г., Сергеева Т.Н.

Удмуртский государственный университет, Ижевск, Россия

Введение. Рециркуляции лимфоцитов между лимфоидными органами обеспечивают системную реакцию иммунной системы на чужеродные антигены. Получены свидетельства того, что тимус - центральный орган антигенезависимого лимфопоза - также может быть вовлечен в рециркуляцию зрелых Т-клеток. Было обнаружено, что в норме часть Т-лимфоцитов обладает способностью выходить из крови в мозговую зону тимуса (Michie,Rouse,1989), а антигенная стимуляция увеличивает интенсивность такой миграции (Naparstek et al, 1982; Fink et al, 1984; Ben-Nun, Cohen, 1982). На основании этих наблюдений высказано предположение о возможном участии периферических Т-лимфоцитов в процессах селекции тимоцитов и формировании иммунологической памяти (von Boehmer H., 1997; Ярилин А.А., 1999). Однако в настоящий момент ни молекулярные механизмы, лежащие в основе миграции зрелых лимфоцитов в тимус, ни функциональное значение самого феномена остаются до конца не изученными. Известно, что ретикуло- эпителиальная строма тимуса вовлечена в контроль созревания и миграции Т-клеток посредством прямых межклеточных взаимодействий и секреции паракринных факторов. Ранее мы сообщали об обнаружении в клетках стромы мозговой зоны долек тимуса нейрональной изоформы нитроксидсинтазы, участвующей в синтезе свободнорадикального газа монооксида азота. Интенсивность ее экспрессии значительно падает после интраперитонеального введения бактериального эндотоксина (Сергеев и соавт., 2004). Сопоставление вышеприведенных данных делает логичным предположение о вовлеченности монооксида азота в механизмы миграции зрелых Т-клеток в тимус.

Цель и задачи исследования. Поставленная в работе цель: изучение молекулярных механизмов, лежащих в основе процессов миграции зрелых Т-лимфоцитов в тимус крыс в норме и после антигенной стимуляции иммунной системы, потребовало решения следующих задач: 1) Проследить динамику миграции меченных в циркуляторном русле лимфатических клеток в тимус крыс в норме и после интраперитонеального введения бактериального липополисахарида (ЛПС), в сравнении с группой животных, которым интратимически вводился блокатор синтеза монооксида азота (7-нитроиндазол); 2) Проследить динамику изменений числа зрелых CD4$^+$- и CD8$^+$- Т-лимфоцитов в тимусе крыс в этих же экспериментальных условиях.

Материалы и методы. В эксперименте использовали 30 крыс-самцов линии Вистар весом 150-180 г. Исследовали: контрольную группу животных (10 крыс) с интратимическим введением стерильного физраствора (0,5 мл); первую экспериментальную группу (10 крыс) с интраперитонеальным введением ЛПС (125 мкг/кг) и вторую экспериментальную группу (10 крыс) с интратимической инъекцией 7-нитроиндазола (7-НИ; 50 мк/кг в 0,5 мл. физраствора на фосфатном буфере). Мечение циркулирующих клеток крови производили однократным интракардиальным введением ФИТЦ (0,1% в 0,5 мл физраствора на фосфатном буфере) непосредственно перед основными экспериментальными процедурами. Через 4 часа после введения фармакологических средств у наркотизированных животных вскрывали грудную клетку и транскардиальной инфузией физраствора вымывали кровь из сосудов. Тимус иссекали и замораживали для получения криостатных срезов толщиной 14 мкм. Каждый второй срез подвергали стандартной процедуре двойного иммуногистохимического окрашивания CD4$^+$- и CD8$^+$- Т-клеточных маркеров. Подсчет меченых клеток в паренхиме органа и измерения площадей зон тимуса вели с помощью люминесцентного микроскопа и морфометрической программы «Media cybernetics 5,0».

Основные результаты. Интраперитонеальное введение ЛПС и интратимическое введение 7-НИ в обоих случаях приводило к снижению экспрессии нейрональной нитроксидсинтазы (-48,2 ± 3,9 и -54,2 ± 4,8% соответственно) и увеличению числа меченых лимфоцитов, мигрировавших из кровотока в мозговую зону тимуса (+240,8 ± 28,8 и +211,3± 25,4% соответственно). Однако подсчет числа CD4$^+$- и CD8$^+$- иммунопозитивных клеток продемонстрировал значительные различия между экспериментальны-

ми группами. Введение 7-НИ приводило к достоверному пропорциональному росту $CD4^+$- и $CD8^+$- Т-клеток в мозговой зоне тимуса, тогда как после интраперитонеального введения ЛПС отмечался значимый рост числа только $CD8^+$- Т-лимфоцитов.

Заключение. Полученные данные свидетельствуют о том, что снижение выработки монооксида азота стромальными клетками мозговой зоны инициирует выход зрелых Т-клеток из кровотока в эту область тимуса. Возможно, такая реакция является компонентом комплексной реакции тимуса на антигенную стимуляцию иммунной системы. Преобладание среди мигрировавших клеток $CD8^+$- Т-лимфоцитов после введения ЛПС позволяет предположить, что вызванные этим антигеном внутритимусные реакции (например, описанный нами ранее синтез в мозговом слое простагландинов и усиление лимфоцитарного апоптоза) могут избирательно контролировать численный состав мигрировавших в тимус $CD4^+$- Т-лимфоцитов.

ЦИТОКИНОВАЯ РЕГУЛЯЦИЯ МЕТАБОЛИЗМА ЛИПОФИЛЬНЫХ ЭНДОБИОТИКОВ

Сибиряк С.В.

Всероссийский центр глазной и пластической хирургии, Уфа Россия

Окислительная биотрансформация липофильных сигнальных молекул – стероидов, эйкозаноидов, ретиноидов осуществляется при участии цитохром Р450-зависимых монооксигеназ. Основными эндогенными регуляторами экспрессии различных изоформ цитохрома Р450, участвующих в биосинтезе и катаболизме липофильных соединений, являются цитокины (в первую очередь провоспалительные цитокины – IL-1, TNF, IL-6 и др.). Цитокины контролируют стероидогенез в надпочечниках, продукцию половых стероидов, метаболизм холестерина и желчных кислот, биосинтез "цитохромных" метаболитов арахидоновой кислоты (эпоксиэйкозатриеновых и гидроксиэйкозатетраеновых кислот – важнейших регуляторов гемодинамики). "Неиммунные" эффекты провоспалительных цитокинов обеспечивают, в частности, адаптацию организма в условиях "инфекционного стресса" и свидетельствуют об универсальной роли иммунной системы в регуляции биологических функций.

РОЛЬ ПРОЛАКТИНА В ИММУНОРЕГУЛЯЦИИ ПРИ ТРАВМАТИЧЕСКОЙ БОЛЕЗНИ

Соколова Т.Ф., Долгих Т.И., Турок Н.Е.

Омская государственная медицинская академия, Омск, Россия

Введение. Известно, что в ответ на стрессорное воздействие уровень пролактина в крови повышается и это предотвращает развитие стрессиндуцированной иммуносупрессии (Немирович-Данченко и др., 2002; 2003). Пролактин активирует функцию иммунной системы (Matera, 1997), стимулирует гуморальный и клеточный иммунный ответ (Berczi et. al., 1988, 2003), повышает фагоцитарную активность лейкоцитов (Koller et. al., 1997) и макрофагов (Ortega et. al., 1998), продукцию цитокинов (Gaytan et. al.,1997). Однако работ, определяющих роль пролактина в регуляции иммунного ответа при тяжелой механической травме практически нет.

Целью работы было изучение изменения уровня пролактина и его значение в обеспечении иммунного ответа, влияние на продукцию про- и противовоспалительных цитокинов в динамике травматической болезни (ТБ).

Материалы и методы. Проведено 2 серии экспериментов на 97 белых крысах-самцах массой 210-230 граммов. В первую вошли животные, выжившие после моделирования по Ноблу-Коллипу тяжелой механической травмы. Во второй серии, включающей 6 групп, моделирование травмы сочеталось с иммунизацией животных эритроцитами барана. Крысам 1-й и 2-й групп травма наносилась в продуктивной и индуктивной фазах иммунного ответа. Животных 3-6 групп иммунизировали на 2, 9, 16, 25 сутки посттравматического периода. Исследования проводились на пике иммунного ответа (5-е сутки после иммунизации) через 1, 3, 7, 14, 21, 30 суток после нанесения травмы. Контрольные группы составили 16 интактных крыс и 18 иммунизированных животных. Обследовано 33 больных с тяжелой сочетанной черепно-мозговой травмой (ТСЧМТ). Контрольную группу составили 15 здоровых доноров. Содержание пролактина в сыворотке крови определяли радиоиммунными наборами (Франция), количество антителообразующих клеток (АОК) по Cunningham, уровень цитокинов: фактор некроза опухоли-α (TNFα), интерлейкин1β (IL-1β), интерлейкин 4 (IL-4) определяли иммуноферментным методом на тест-системах «Протеиновый контур» (С.-Петербург). Статистическую обработку данных проводили с использованием средней арифметической и её ошибки, критерия Стьюдента.

Основные результаты. В результате экспериментальных исследований было установлено, что через сутки после нанесения травмы содержание пролактина превышало контрольные значения более чем в 2 раза (16,4±3,0 мМЕ/л против 7,5±2,5 мМЕ/л в контроле, $p<0,01$). С 3-их суток ТБ отмечена тенденция к снижению количества гормона в крови, уровень пролактина в этот период перестает статистически значимо отличаться от контрольных значений, к 7-м суткам ТБ нормализуется и остается таковым до конца срока наблюдения. Аналогичные изменения пролактина в динамике ТБ регистрировались в группах иммунизированных животных. Так, через одни сутки после нанесения травмы в продуктивной фазе иммунного ответа содержание гормона составило 25,6±2,9 мМЕ/л ($p<0,01$). При этом число АОК не отличалось от контрольного. На 3-и сутки посттравматического периода (при травматическом воздействии в индуктивной фазе иммунного ответа) изменения уровня пролактина имели ту же направленность, что и у крыс 1-й группы, количество гормона снизилось в 1,5 раза. При этом наблюдалась выраженная посттравматическая иммуносупрессия: число АОК составило $17,5±3,1x10^3$ кл. против $60,9±8,4x10^3$ кл. в контроле. Введение антигена в различные сроки после травмы, как правило, не приводило к подъему уровня пролактина, а также развитию оптимального иммунного ответа, иммунодефицит был выражен до 30 суток ТБ.

Повышение содержания пролактина в раннем периоде болезни отмечено и у выживших больных с ТСЧМТ (358,0±69,4 мМЕ/л против 125,2±26,2 мМЕ/л в контроле, $p<0,01$). У данных больных выявлено увеличение уровня цитокинов с функцией медиаторов воспаления - в 2,5 раза содержания TNF-α (82,7 ±13,3 пг/мл против 33,1± 5,1, $p<0,05$) и почти в 4 раза IL-1β (135,4±13,3 пг/мл против35,1±6,1, $p<0,05$). Одновременно у больных ТБ наблюдалось 7-кратное увеличение количества IL-4

(129,6±43,7 пг/мл против17,9±4,4пг/мл, p<0,05) - цитокина, обладающего мощным противовоспалительным действием.

Заключение. Таким образом, полученные результаты клинико-экспериментальных исследований свидетельствуют об иммунопротективном действии пролактина в раннем посттравматическом периоде, а одним из механизмов иммунопротективного действия пролактина может явиться усиление пролактином синтеза и освобождения цитокинов.

ВЛИЯНИЕ БЛОКАТОРА ГИСТОН-ДЕАЦЕТИЛАЗЫ НА РАЗВИТИЕ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ОСТРОЙ ПОЧЕЧНОЙ НЕДОСТАТОЧНОСТИ *IN VIVO*

Соловьёв А.Г.[1], Melnikov V.Y.[2], Резников Л.Л.[3], Назаров П.Г.[4], Dinarello C.A.[3]

[1]Учреждение ГУЗ Городская Больница № 12 – Центр гемокоррекции, Санкт-Петербург, Россия;

[2]University of Ohio, Shool of Medicine;

[3]University of Colorado, School of Medicine, Denver, Colorado, USA;

[4]Институт экспериментальной медицины РАМН, Санкт-Петербург, Россия

Проблема лечения и предупреждения острой почечной недостаточности (ОПН) является одной из центральных проблем в мировой нефрологии. Эта проблема тесно связана с клинической практикой специалистов разного профиля и, следовательно, существует множество различных подходов к пониманию механизмов и терапевтических стратегий лечения ОПН.

ОПН составляет 5 % всех поступлений в стационары, смертность при этом остается в пределах 30-80%. Наиболее частыми причинами развития ОПН у стационарных больных являются ишемия и сепсис (Melnikov, Ecder et al. 2001).

В практике в исследованиях на животных применяется несколько моделей ОПН, такие как: ишемическая/реперфузионная модель (Melnikov, Faubel et al. 2002), модель острой травмы (индуцированная в/м введением глицерина) (Rauh, Oster et al. 1975; Shulman, Yuhas et al. 1993), токсическая модель, обусловленная введением солей тяжелых металлов (Yanagisawa 1998), и другие методики. В свете последних исследований основная роль при остром и хроническом повреждении почечной паренхимы отводится касакаду про- и противовоспалительных цитокинов, таких как TNFα (Yanagisawa, Nodera et al. 1998), IL-1α (Andersson, Cederholm et al. 2002), IL-6 (Niimi, Nakamura et al. 2002) IL-12 (Leoni, Zaliani et al. 2002), IL-18, IFNγ, IL-8 (Melnikov, Ecder et al. 2001; Melnikov, Faubel et al. 2002), а также некоторым другим факторам, также обладающим повреждающим действием: Ang II, TGFβ (Abbate, Zoja et al. 2002), iNOS-синтазе, эндотелину 1 (Yanagisawa, Nodera et al. 1998), NFkappaB (Abbate, Zoja et al. 2002),. каспазе 1 (Melnikov, Ecder et al. 2001; Melnikov, Faubel et al. 2002). Доказано, что селективная блокада IL-18 специфической антисывороткой имеет выраженный защитный эффект при ишемическом повреждении почек у мышей (Melnikov, Ecder et al. 2001).

В данной работе мы использовали экспериментальную ишемическую реперфузионную модель ОПН у лабораторных мышей C57Bl/6 с целью изучения механизмов возникновения и иммунологического подхода к терапии ОПН. Мы предположили что неспецифическая блокада синтеза провоспалительных цитокинов может способствовать предотвращению и/или лечению острого ишемического повреждения почек *in vivo* и, следовательно, предотвращению их функциональной несостоятельности. Для неспецифической блокады синтеза цитокинов мы использовали препарат SAHA (субероиланилид гидроксамовой кислоты), антицитокиновое действие которого описано в литературе (Leoni, Zaliani et al. 2002). SAHA ингибирует ядерный фермент гистон-деацетилазу (далее HDAC), чем обусловлен его противоопухолевый цитостатический эффект (Leoni, Zaliani et al. 2002; Remiszewski, Sambucetti et al. 2002). Вместе с тем, SAHA подавляет синтез многих цитокинов, благодаря чему проявляет выраженные противовоспалительные свойства (Leoni, Zaliani et al. 2002; Reddy, Maeda et al. 2004).

Нам удалось значительно снизить тяжесть наступившей ОПН у лабораторных мышей, вводя раствор SAHA *per os* или внутрибрюшинно. Препарат действовал только в случае превентивного введения за 30 мин до планируемого ишемического повреждения (симметричного одновременного клампирования почечных артерий). Причем его эффект при введении *per os* оказался более выраженным, чем при внутрибрюшинном введении, что выразилось в статистически значимом снижении уровней креатинина и мочевины крови (p<0,05) более чем в 2 раза уже при дозе SAHA 30 мг/кг *per os* (или дозе SAHA 100 мг/кг внутрибрюшинно) по сравнению с показателями контрольной группы мышей, не получавших никакого лечения. Гистологический контроль срезов почек мышей показал также значительное уменьшение лейкоцитарной инфильтрации, что выразилось в снижении показателя ATN-score в сравнении с контролем.

Таким образом, мы наблюдали выраженный защитный эффект превентивной неспецифической противоцитокиновой терапии на ишемизированные почки лабораторных мышей. Также мы объективно доказали, что при уже состоявшемся повреждении и запуске интерлейкиновых каскадов лечение SAHA не даёт значимого лечебного эффекта.

На основании нашего исследования можно наметить новую стратегию в профилактике ишемического повреждения почек, что, несомненно, может быть полезно в трансплантологии, сердечно-сосудистой хирургии, лечении септических интоксикаций, последствий шоков различного генеза.

СПОСОБНОСТЬ ЧЕЛОВЕЧЕСКОГО АНГИОТЕНЗИНА II ВЫЗЫВАТЬ СИНТЕЗ ПРОВОСПАЛИТЕЛЬНЫХ И ПРОТИВОВОСПАЛИТЕЛЬНЫХ ЦИТОКИНОВ В КУЛЬТУРЕ КЛЕТОК КРОВИ ЧЕЛОВЕКА *IN VITRO*

Соловьёв А.Г.[1], Резников Л.Л.[2], Назаров П.Г.[3], Charles A. Dinarello[2]

[1]Учреждение ГУЗ городская больница № 12 – Центр гемокоррекции, Санкт-Петербург, Россия;

[2]University Of Colorado, School of Medicine, Denver, Colorado, USA;

[3]Институт экспериментальной медицины РАМН, Санкт-Петербург, Россия

Известно, что активация ренин-ангиотензиновой системы происходит при множестве патологических состояний и условий, возникающих в человеческом организме,

и ведет к неспецифическому повреждению почечной паренхимы (Ruiz-Ortega, Esteban et al., 2003). Активный ангиотензин II (Ang II) образуется из предшественника (ангиотензина I) под влиянием ангиотензин-конвертирующих металлопротеиназ – химазы I тучных клеток (CD143) и ее сплайсинг изоформы, регулируемой андрогенами (Lattion, Soubrier et al., 1989). Ингибиторами конвертаз ангиотензина являются каптоприл, фосфорамидон (Gearing, Beckett et al., 1994; McGeehan, Becherer et al., 1994), α_1-химотрипсин плазмы (Jenne, Tschopp, 1991). Помимо общеизвестных физиологических механизмов действия (вазиконтрикция и др.), Ang II участвует в развитии CCl_4-индуцированного фиброза печени у крыс, причем его медиаторная роль реализуется через цитокиновую сеть и отменяется введением противовоспалительного цитокина IL-10 (Wang, Zhang et al., 2003). Также показано что Ang II посредством своих специфических рецепторов 1 типа (AT 1) участвует в LPS-индуцированном синтезе IL-1β и IL-6 *in vivo* и *in vitro* (Miyoshi, Nagata et al., 2003).

Однако характер влияния Ang II на цитокиновую сеть, его способность непосредственно выступать в качестве инициирующего фактора синтеза цитокинов не изучены. Не известно, как влияет Ang II на продукцию провоспалительных цитокинов, необходимых как для развития, так и для ограничения воспалительного процесса. С целью выяснения этих вопросов мы изучили влияние препарата Ang II на продукцию нескольких про- и противовоспалительных цитокинов (IL-1β, IL-8, IL-1Ra, IFNγ) клетками крови человека *in vitro*. Экспериментальной моделью являлись 24-часовые культуры разбавленной донорской крови в среде RPMI 1640. Для стимуляции синтеза цитокинов в культуры вносили раствор Ang II человека (Sigma, St.Louis Missouri) в различных концентрациях (250, 500 и 1000 нМ). Активированные клетки осаждали центрифугированием и в супернатанте исследовали содержание цитокинов методом жидкостной хемоэлектролюминесценции. Как показали полученные данные, препарат Ang II человека стимулировал синтез всех изученных цитокинов. Стимуляция синтеза цитокинов в культурах клеток крови человека была пропорциональна применяемой дозе. Максимальный уровень прироста продукции цитокинов по сравнению с контрольными культурами (3-10-кратный и более высокий, $p<0,05$) достигался при концентрации Ang II 1000 nM, что значительно выше референс-уровня Ang II, принятого для плазмы крови здорового человека (van de Wal, Plokker et al., 2006). Для исследований в дальнейшем мы применяли Ang II в дозах 250 и 500 nM как наиболее надежный и нетоксичный для культуры клеток стимул.

Таким образом, результаты нашего исследования показали, что ангиотензин II человека обладает способностью непосредственно индуцировать синтез как провоспалительных, так и противовоспалительных цитокинов в лейкоцитах крови человека. Это подтверждает многочисленные литературные данные об участии Ang II в патогенезе воспалительных процессов, указывая на то, что провоспалительные свойства Ang II могут осуществляться путем прямого воздействия на пути цитокиновой регуляции воспаления. Полученные данные указывают на более сложный патогенез гипертонической болезни, где наряду с вазоконстрикторными свойствами ангиотензина II определяющими нарушения системной гемодинамики, можно говорить о воспалительном компоненте, способном индуцировать местные воспалительные изменения сосудистой стенки, определять активацию и миграцию клеток крови и т.д. Учитывая это, лечение гипертонических состояний может требовать присоединения умеренной противовоспалительной терапии.

МЕХАНИЗМ СТИМУЛИРУЮЩЕГО ВЛИЯНИЯ АНГИОТЕНЗИНА 2 НА СИНТЕЗ ХЕМОКИНА IL-8 ЛЕЙКОЦИТАМИ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА: РОЛЬ IL-1β И IL-18

Соловьёв А.Г.[1], Резников Л.Л.[2], Назаров П.Г.[3], Charles A. Dinarello[2]

[1]Учреждение ГУЗ городская больница № 12 – Центр гемокоррекции, Санкт-Петербург, Россия;

[2]University Of Colorado, School of Medicine, Denver, Colorado, USA;

[3]Институт экспериментальной медицины РАМН, Санкт-Петербург, Россия

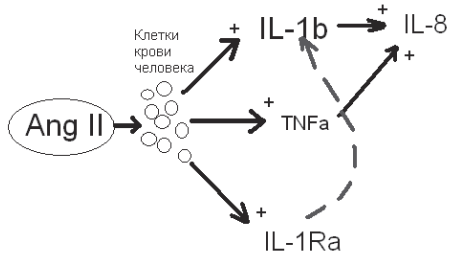
В течение последних нескольких лет активно обсуждается цитокиноподобное действие вазоактивного пептида ангиотензина 2 (Ang 2) и продуктов его деградации – ангиотензина 3 и 4. Физиологические свойства этих пептидов хорошо описаны. Новостью явилась их способность быть индукторами синтеза провоспалительных цитокинов. Доказан факт индукции с помощью Ang 2 синтеза TNFα и IL-6 в почках крыс *in vivo* (Ruiz-Ortega et al., 2002), IL-1 (Noronha et al., 2002). Также имеются данные о способности Ang 2 влиять на синтез факторов роста, таких как TGFβ (Ding et al., 2001), синтез простагландинов в клетках эпителия почек (Nakamura et al., 2002), внутриклеточную активацию фактора NF-kappaβ (Ruiz-Ortega et al. 2002), индуцибельной NO-синтазы (Neworal et al., 2003), что, в свою очередь, дополнительно запускает провоспалительные цитокиновые каскады. Таким образом, меняется и сам подход к данному гормону и в целом к роли и функции ренин-ангиотензиновой системы в норме и патологии.

Целью нашего исследования явилось изучить цитокиноподобную активность Ang 2 при индукции про- и противовоспалительных факторов организма и роль Ang 2 в поддержании баланса между ними.

1. Удалось установить, что стимуляция культуры клеток крови человека *in vitro* рекомбинантным препаратом Ang 2 человека в концентрациях от 250 до 1000 нМ стимулирует продукцию IL-1β и хемокина IL-8 дозозависимым образом. По сравнению с контролем (культурами нестимулированной крови в среде RPMI 1640) под действием Ang 2 наблюдалось статистически значимое увеличение продукции IL-8 ($p<0,05$, $p<0,01$). В дальнейших экспериментах мы использовали концентрацию Ang 2 500 нМ.

2. Также можно утверждать, что синтез IL-8 в нашей модели является TNFα- и IL-1β-опосредованным. Это подтверждается тем, что при блокировании IL-1β и TNFα с помощью соответствующих растворимых рецепторов (IL-1Ra – рекомбинантного антагониста рецептора IL-1 и TNF-Rp – растворимого рекомбинантного рецептора TNFα) продукция IL-8 статистически значимо снижалась ($p<0,05$).

3. Стимулированная Ang 2 продукция IL-8 в меньшей степени зависела от IL-18. Это показано с помощью рекомбинантного белка IL-18BP, связывающего и нейтрализующего IL-18. При добавлении IL-18BP в культуры клеток крови, стимулированные Ang 2 в дозах от 125 до 500 нМ, стимуляция синтеза IL-8 либо не изменялась по сравнению с контролем, либо снижалась незначительно. Лишь при стимуляции культур Ang 2 в дозе 1000 нМ наблюда-



лось существенное и достоверное снижение продукции IL-8 в присутствии белка IL-18BP ($p<0,05$). Эти данные указывают на менее приоритетную роль IL-18 (по сравнению с IL-1β и TNFα) в контроле цитокинового каскада, активируемого Ang II. Синтез IL-8 является IL-18-независимым при большинстве доз Ang 2 как стимулятора (от 125 до 500 нМ).

4. Итак, мы установили, что под действием стимулятора Ang 2 запускается каскад синтеза цитокинов провоспалительного ряда: IL-8, IL-1β. Возникает вопрос – реагирует ли белая кровь активацией противовоспалительной системы? В рамках настоящей работы мы установили, что имеется дозозависимое увеличение выработки эндогенного IL-1Ra при стимуляции клеток крови различными концентрациями Ang 2.

Полученные данные можно обобщить в следующую схему (см. рисунок).

Таким образом, результаты нашего исследования подтверждают новый подход к общеизвестному вазоактивному пептиду ангиотензину 2 как к одному из провоспалительных цитокинов или цитокиноподобному фактору. Данные литературы подтверждают, что повышенный уровень этого гормона крови может быть связан с поражением различных органов и систем: сердца и сосудов (Unger, 2002), хроническими заболеваниями почек (Noronha et al., 1995), заболеваниями печени (Kanno et al., 2005).

ФЕНОТИПИЧЕСКИЕ ИЗМЕНЕНИЯ МОНОЦИТОПОДОБНЫХ КЛЕТОК ЛИНИИ THP-1 В ПРОЦЕССЕ ТРАНСЭНДОТЕЛИАЛЬНОЙ МИГРАЦИИ

Старикова Э.А., Соколов Д.И.[1], Сельков С.А.[1], Амчиславский Е.И., Чернова А.А., Фрейдлин И.С.

ГУ НИИ экспериментальной медицины РАМН, Санкт-Петербург, Россия,

** ГУНИИ акушерства и гинекологии им. Д.О. Отта*

Дифференцировка мононуклеарных фагоцитов в макрофаги или миелоидные дендритные клетки связана с миграцией из кровеносного русла в ткани. Большое количество факторов потенциально способны регулировать этот процесс *in vivo*. Это эндотелиальные клетки, клетки стромы, продукты их секреции, молекулы межклеточного матрикса и др.

Цель данного исследования состояла в оценке способности эндотелиальных клеток влиять на фенотип мононуклеарных фагоцитов при трансэндотелиальной миграции.

Для создания модели трансэндотелиальной миграции *in vitro* использовали человеческие моноцитоподобные клетки линии THP-1 и человеческие эндотелиальные клетки линии EA.hy 926. Фенотип клеток THP-1 оценивали при:

- трансмиграции через интактный монослой эндотелиальных клеток;
- при трансмиграции через монослой эндотелиальных клеток, после преинкубации в присутствии TNFα, IFNγ и IL-4 и последующей отмывки;
- при трансэндотелиальной миграции в присутствии TNFα, IFNγ и IL-4 в субэндотелиальном пространстве.

Изменения экспрессии поверхностных молекул CD11b, HLA-DR и CD14 на клетках THP-1 оценивали методом проточной цитофлюорометрии.

Молекулы CD11b, HLA-DR и CD14 конститутивно экспрессировались на клетках THP-1. При трансэндотелиальной миграции через интактный монослой эндотелиальных клеток на клетках линии THP-1 было зарегистрировано достоверное повышение уровня экспрессии CD11b и HLA-DR. Уровень экспрессии CD14 достоверно не изменялся.

Таким образом, трансэндотелиальная миграция приводит к изменениям поверхностного фенотипа клеток линии THP-1.

Трансэндотелиальная миграция клеток THP-1 в присутствии TNFα, IFNγ и IL-4 в субэндотелиальном пространстве вызывала более значительные изменения экспрессии исследуемых поверхностных молекул по сравнению с изменениями уровней экспрессии этих маркеров на клетках THP-1, инкубированных в присутствии этих же цитокинов.

Трансэндотелиальная миграция в присутствии TNFα и IFNγ вызывала достоверно более сильные изменения уровней экспрессии всех исследуемых маркеров по сравнению с уровнем экспрессии этих же маркеров на клетках THP-1, которые трансмигрировали через интактный эндотелий. В то же время, изменения фенотипа клеток линии THP-1 при трансмиграции через монослой эндотелиальных клеток, преинкубированный в присутствии цитокинов, достоверно не отличались от изменений фенотипа клеток THP-1 после трансмиграции через интактный эндотелий.

Уровень экспрессии исследуемых маркеров на фракции клеток THP-1, которые не прошли трансэндотелиальной миграции (остались над монослоем эндотелиальных клеток), не отличался от уровня экспрессии этих маркеров на интактных клетках THP-1.

Вероятно, после трансэндотелиальной миграции мононуклеарные фагоциты становятся более чувствительными к действию цитокинов.

Работа поддержана грантами: РФФИ 03-04-48118, НШ-540.2003.4.

СИНТЕЗ ФАКТОРОВ СЕМЕЙСТВА VEGF И ИХ РЕЦЕПТОРОВ В КЛЕТКАХ ИММУННОЙ СИСТЕМЫ

Степанова О.И., Крылов А.В., Людыно В.И., Киселева Е.П.

НИИ экспериментальной медицины РАМН, Санкт-Петербург, Россия

В настоящее время фактор роста сосудистого эндотелия (VEGF-A) считается основным медиатором роста кровеносных, а VEGF-C – лимфатических сосудов. Действие данных факторов в отношении эндотелия осуществляется путем взаимодействия с тремя тирозинкиназными рецепторами: VEGFR1, VEGFR2, VEGFR3, а также с корецепторами – нейропилинами 1 и 2 (NRP1 и NRP2). Клетки иммунной системы играют важную роль в регуляции ангиогенеза. Синтез VEGF-A и VEGF-C и их рецепторов на клетках иммунной системы мало изучен.

Целью настоящего исследования является изучение экспрессии мРНК рецепторов семейства VEGF: VEGFR1, VEGFR2, VEGFR3 и нейропилиновых корецепторов (NRP1, NRP2), а также экспрессии мРНК собственно VEGF-A и VEGF-C в клетках иммунной системы мыши. В качестве объектов исследования были взяты изолированные тимоциты, стромальные клетки тимуса, макрофаги и лимфоузлы интактной мыши. Стромальные клетки тимуса были получены после раздавливания тимуса и пропускания клеточной суспензии через фильтр в виде остатков на фильтре. Из клеток перитонеального экссудата макрофаги были выделены путем отмывания монослоя от неприлипающих к стеклу клеток. Ткань легкого, богатая сосудами, была взята в качестве положительного контроля. Оценку экспрессии мРНК всех исследуемых объектов проводили методом обратной транскрипции с последующей полимеразной цепной реакцией (ОТ-ПЦР) со специфическими праймерами, подобранными таким образом, чтобы длина продукта при прохождении реакции на кДНК и ядерной ДНК, была разной. В качестве внутреннего стандарта прохождения ОТ использовали β-актин. Результаты визуализировали при помощи электрофореза в геле, окрашенном бромистым этидием.

Результаты исследований показали, что изолированные тимоциты экспрессируют мРНК VEGFR2, VEGFR3, NRP-1 и не экспрессируют VEGFR-1. Стромальные клетки тимуса и макрофаги экспрессируют мРНК всех трех типов рецепторов для VEGF и мРНК нейропилинов. Для сравнительной характеристики с клетками другого гистогенеза (но не эндотелиального происхождения) была исследована экспрессия мРНК рецепторов VEGF в перевиваемой культуре клеток гепатомы 22А. В них была выявлена экспрессия VEGFR-1 и VEGFR-3 и отсутствовала экспрессия мРНК VEGFR-2 и NRP-1. Экспрессия генов самих ангиогенных факторов – VEGF-A и VEGF-C наблюдалась во всех изученных нами клетках иммунной системы и ткани легкого; клетки гепатомы синтезировали VEGF-A, но не синтезировали VEGF-C.

Таким образом, результаты исследования показали, что клетки иммунной системы нормальных мышей (тимоциты и макрофаги) без какой-либо дополнительной активации способны конститутивно синтезировать ангиогенные факторы и рецепторы к ним. Способность иммунокомпетентных клеток к синтезу VEGF-A и VEGF-C может определять их участие в процессах роста кровеносных и лимфатических сосудов. Рецепторы к этим факторам могут играть роль в процессах трансэндотелиальной миграции макрофагов и лимфоцитов.

Работа была поддержана грантами РФФИ 06-04-48250а и НШ-540.2003.4.

MIF И ГИАЛУРОНОВАЯ КИСЛОТА: ВОЗМОЖНЫЕ МЕХАНИЗМЫ ВЗАИМНОГО ВЛИЯНИЯ В РЕГУЛЯЦИИ МИГРАЦИИ МАКРОФАГОВ

Суслов А.П., Самойленко И.И., Третьяков О.Ю., Кохановская Н.А., Коноплева М.В., Вовк В.А.

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

MIF – повсеместно распространенный белок, способный функционировать как цитокин, гормон и фермент. Важной провоспалительной функцией MIF является подавление миграции и активация макрофагов в очаге воспаления. Миграцию воспалительных клеточных элементов (макрофагов, нейтрофилов, клеток эпителия) регулирует также гиалуроновая кислота (ГК). Нами установлено, что MIF и гиалуроновая кислота, каждый по отдельности, подавляют миграцию макрофагов *in vitro*. В то же время, MIF и ГК, взятые вместе, отменяют подавление, а при определенном соотношении даже усиливают миграцию этих клеток. Известно, что ГК является лигандом для клеточного рецептора CD44. CD44 связан с цитоскелетом клеток, и его взаимодействие с ГК играет важную роль в регуляции клеточной миграции. Кроме того, CD44 необходим для активации CD74, который, в свою очередь, является рецептором для MIF. Мы предполагаем, что выявленная нами взаимная интерференция активностей MIF и ГК, приводящая к отмене подавления или стимуляции клеточной миграции, может происходить на поверхностной клеточной мембране в процессе формирования комплексов CD44-ГК и CD74-MIF.

РАЗЛИЧИЯ В СПОСОБНОСТИ ДВУХ БЛИЗКОРОДСТВЕННЫХ ШТАММОВ ВИРУСА ПТИЧЬЕГО ГРИППА H9N2 ВЫЗЫВАТЬ АПОПТОЗ В ПЕРВИЧНОЙ КУЛЬТУРЕ КЛЕТОК ГЛАЗА КУРИНОГО ЭМБРИОНА

Тендлер Е.[1] , Банет-Ноах К.[2], Перк С.[2], Симанова Л.[2], Гребенюк Н.[2], Розенблат Е.[2] , Зиндер О.[1,3] и Паньшин А.[2]

[1]Медицинский Центр Рамбам, Хайфа, Израиль;

[2] Ветеринарный Институт им. Кимрона (Комарова);

[3] Медицинский факультет, Технион, Хайфа, Израиль

В 1997 году была доказана способность вируса птичьего гриппа вызывать гриппоподобные заболевания у людей. В дальнейшем было показано, что подобной способностью обладают вирусы, относящиеся к трем следующим подтипам: H5N1, H7N7 и H9N2. Именно эти вирусы являются наиболее вероятными кандидатами на роль будущего пандемического вируса.

С 2000 года среди домашних птиц в Израиле циркулирует низко патогенный вирус птичьего гриппа H9N2. В течение шести лет эпизоотии в Израиле было выделено около 400 вирусов. На основании анализа нуклеотидной последовательности вирусных генов все израильские вирусы подразделялись на две основные группы. Первую составили вирусы, изолированные до мая 2003 года, а вторую - вирусы, изолированные с мая 2003 по настоящее время. Было установлено, что вирусы второй группы обладают достоверно более высокой способностью индуцировать программированную клеточную смерть (апоптоз) в первичной культуре глаза эмбриона цыпленка по сравнению с вирусами первой группы. Так как апоптоз в ответ на вирусную агрессию является одним из основных факторов неспецифического противовирусного иммунитета, реализуемого на клеточном уровне, способность вирусов регулировать эту реакцию, как правило, ассоциирована с их способностью к размножению в клетках хозяина. Показано, что белок NS1 вируса гриппа - это основной регуляторный компонент апоптотической активности вируса гриппа. При анализе аминокислотной последовательности NS1 протеина израильских изолятов показано, что этот белок у вирусов первой и второй групп различается только по четырем аминокислотным заменам в позициях 70,

76, 143 и 171. Таким образом, различия в апоптотической активности могут быть ассоциированы со следующими аминокислотными замещениями в молекуле NS1: E70K, A76E, T143A, N171T. Поскольку только позиция 143 принадлежит функционально активному участку молекулы - эффекторному домену, наиболее вероятно, что именно T143A замещение ответственно за наблюдаемые различия в апоптотической активности изученных вирусов.

TWO CLOSELY RELATED AVIAN INFLUENZA H9N2 VIRUS STRAINS POSSESS THE ABILITY TO CAUSE APOPTOSIS IN CULTURED PRIMARY CHICKEN EMBRYONIC EYE CELLS

Tendler Y.[1], Banet-Noach C.[2], Perk S.[2], Simanov L.[2], Grebenyuk N.[2], Rozenblut E.[2], Zinder O.[1,3], Panshin A.[2]

[1] Rambam Medical Center, Haifa, Israel;

[2] Division of Avian and Aquatic Diseases, Kimron Veterinary Institute, Beit Dagan, Israel;

[3] Clinical Laboratory Sciences Program, Faculty of Medicine, The Technion

The ability of a number of avian influenza viruses to cause flu-like diseases in humans has been proven in 1997. It has further been shown, that the viruses possessing this ability belong to the three following subtypes: H5N1, H7N7 and H9N2. These viruses are the most probable candidates for a role in the possible future human pandemic virus.

Since 2000, the low pathogenic influenza virus H9N2 has been circulating among poultry in Israel. More than 400 viruses have been isolated in Israel within six years of the epizooty. On the basis of nucleotide sequences, all the Israeli isolates were subdivided into two basic groups. The first group contained the viruses isolated until May 2003, and the second group contained the viruses isolated since May 2003. It has been established that viruses of the second group possess a higher ability to induce programmed cellular death (apoptosis) in primary culture of chicken embryonic eye than viruses of the first group. As apoptosis is one of the major factors of nonspecific antiviral immuno-defense on a cellular level, the ability of viruses to regulate this reaction, as a rule, associates with its ability to persist in the host cells. It has been shown, that influenza virus NS1 protein is the important apoptotic regulation component of the virus. It was also shown, that this protein in viruses of both the first and second groups differs only by four amino acid residues in the 70, 76, 143 and 171 positions. Thus, the differences in apoptotic activity can be associated with presence of the following amino acid replacements at molecule NS1: E70K, A76E, T143A, N171T. As only position 143 belongs to the functionally active site of the molecule (effector's domain), it is most probable that the T143A replacement is responsible for the altered apoptotic activity of the studied viruses.

ОЦЕНКА НЕКОТОРЫХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ КИЛЛИНГА БАКТЕРИЙ НЕЙТРОФИЛАМИ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА ПОД ВЛИЯНИЕМ ИНФРАКРАСНОГО НИЗКОИНТЕНСИВНОГО ЛАЗЕРНОГО ИЗЛУЧЕНИЯ

Тихомирова Е.И., Рудик Д.В., Тучина Е.С.

Саратовский государственный университет имени Н.Г. Чернышевского, Саратов, Россия

Необходимым условием для завершения фагоцитарного процесса является успешный киллинг поглощенных фагоцитом микроорганизмов, обусловленный достаточной активностью различных микробоцидных факторов. При кислороднезависимом киллинге микробоцидный эффект связан с быстрым и глубоким сдвигом pH в кислую сторону в фаголизосомах, действием лизоцима, лактоферрина, кислой и щелочной фосфатаз, катионных белков, гидролитических ферментов, дефензинов. В варианте кислородзависимого киллинга происходит окисление кислорода НАДФ·Н-оксидазной системой, в результате чего образуются активные формы кислорода (АФК), оказывающие сильное микробоцидное действие («респираторный взрыв»), и действие системы миелопероксидаза – перекись водорода.

Изучение функциональных и метаболических изменений в фагоцитирующих клетках под влиянием НИЛИ, как физического фактора, обладающего иммуномодулирующим свойством, имеет большое теоретическое и прикладное значение. Ранее нами было показано, что инфракрасное низкоинтенсивное лазерное излучение (ИК НИЛИ) с длиной волны 850 нм стимулирует завершенность процесса фагоцитоза бактерий нейтрофилами периферической крови человека. В связи с этим представляло интерес изучить влияние этого ИК НИЛИ на изменение таких микробоцидных показателей, как активность кислой (КФ) и щелочной фосфатаз (ЩФ), миелопероксидазы (МПО), образование АФК и содержание катионных белков (КБ) в цитоплазме фагоцитирующих нейтрофилов, что и определило цель нашего исследования.

Материалы и методы. Нейтрофилы выделяли из периферической гепаринизированной крови здоровых добровольцев в двойном градиенте плотности фиколла-верографина 1,077 и 1,092 г/мл и использовали при моделировании *in vitro* процесса фагоцитоза бактерий *Staphylococcus aureus*. Облучение нейтрофилов осуществляли до начала фагоцитоза с помощью лазерного диода с максимумом спектра испускания 850 нм, дозы излучения составили 300, 900 1500 мДж. Через 1, 3 и 6 ч фагоцитоза готовили фиксированные препараты на предметных стеклах. Определение активности КФ, ЩФ, МПО и содержание КБ проводили с помощью цитохимического анализа со стандартными наборами реагентов фирмы «Абрис+» (Санкт-Петербург). Образование АФК регистрировали в НСТ-тесте. Учет результатов осуществляли микроскопически. В качестве контроля использовали микробоцидные показатели нейтрофилов без облучения.

Результаты. Было выявлено достоверное изменение показателей кислородзависимого и кислороднезависимого киллинга бактерий нейтрофилами периферической крови человека на фоне действия ИК НИЛИ (850 нм). Уровень КФ в цитоплазме неактивных нейтрофилов (без бактерий) был достоверно выше при действии всех доз излучения по сравнению с контролем. Существенных различий активности данного фермента в облученных и необлученных клетках через 1 и 6 ч фагоцитоза бактерий выявлено не было. Увеличение содержания КФ отмечено только при действии дозы 300 мДж к 3 ч фагоцитоза. Содержание ЩФ в неактивных нейтрофилах на фоне действия НИЛИ, напротив, снижалось по сравнению с контролем. В ходе фагоцитоза бактерий через 1 ч показатели ЩФ восстанавливались до контрольных значений, к 3 ч статистически увеличивались при действии дозы 600 мДж и значительно снижались при облучении дозой 1500 мДж. Через 6 ч активность фермента была в пределах контроля под влиянием дозы 300 мДж и достоверно выше контрольного значения при действии 600 и 1500 мДж доз НИЛИ.

При определении содержания КБ в цитоплазме нейтрофилов отмечено достоверное превышение контроля к 3 ч фагоцитоза бактерий на фоне действия дозы 1500 мДж. К 6 ч значения КБ были ниже контроля независимо от дозы облучения. Показано стимулирующее действие ИК НИЛИ на активность МПО в фагоцитирующих нейтрофилах при всех используемых дозах через 1 и 3 ч фагоцитоза бактерий. Отмечены различия в образовании АФК по результатам спонтанного и индуцированного НСТ-теста на фоне действия ИК НИЛИ. С увеличением дозы облучения усиливалась способность нейтрофилов к продукции АФК в индуцированном НСТ-тесте.

Таким образом, проведенные нами эксперименты позволяют связать положительный эффект действия ИК НИЛИ на процесс фагоцитоза с одновременной активизацией механизмов кислородзависимого и кислороднезависимого киллинга бактерий в нейтрофилах.

ОЦЕНКА АКТИВНОСТИ НЕЙТРОФИЛЬНЫХ ГРАНУЛОЦИТОВ ПРИ ИНДУЦИРОВАННОЙ РЕГЕНЕРАЦИИ КОЖИ

Тихонина Е.А., Селянина О.Н., Цыбулько Е.А., Турчанинова Е.В., Валамина И.Е., Базарный В.В.

Уральская государственная медицинская академия, Екатеринбург

Нейтрофильные гранулоциты как эффекторные клетки активно участвуют в разнообразных физиологических и патологических процессах. В частности, в последние десятилетия сформировались представления о их важном участии в регуляции регенерации тканей. При этом следует признать, что механизмы участия нейтрофилов в формировании репаративного потенциала тканей далеки от окончательного решения. Несмотря на то, что имеются публикации об изменении качественных и количественных характеристик фагоцитов крови при нормальной и нарушенной регенерации, они не дают ответа на вопрос - каково клинико-прогностическое значение этих показателей при репаративных процессах, что и определило актуальность данного исследования.

Цель работы - изучить взаимосвязь между показателями функционально-метаболической активности нейтрофилов и заживлением кожной раны.

Материалы и методы исследования. Исследование проведено на крысах-самцах породы Вистар. Моделирование кожной раны осуществлялось стандартным хирургическим способом на дорзальной поверхности в условиях легкого эфирного наркоза с соблюдением правил асептики и антисептики (данный фрагмент исследования выполнен совместно с м.н.с. А.И.Исайкиным). В первой группе животных изучали «нормальное» заживление кожной раны. Во второй группе животных с целью стимуляции репаративных процессов внутрибрюшинно вводили 2 мг комплексного препарата гликозоаминогликанов (ГАГ), состоящего из равных частей хондроитин-4сульфата, хондроитин-6сульфата, дерматан сульфата, кератан сульфата и гепаран сульфата (Aliahza, Бразилия). Препарат, растворенный в 1 мл физиологического раствора, вводили трехкратно. Животных забивали на 7-10 сутки после операции.

Оценка нейтрофильных гранулоцитов включала количественные показатели (число нейтрофилов в периферической крови) и функционально-метаболические – миелопероксидаза (МП) и лизосомальный катионный белок (ЛКБ). Количество лейкоцитов в периферической крови определяли унифицированным пробирочным методом. Содержание нейтрофилов подсчитывали в мазках, окрашенных по Романовскому-Гимза. Активность МП определяли по Грэхему-Кнолю, а содержание ЛКБ – в реакции с бромфеноловым синим по М.Г. Шубичу. Результат реакции выражали средним цитохимическим коэффициентом (СЦК) по Каплоу [2].

Регенерацию кожной раны контролировали на основании клинической оценки состояния раны и морфологической картины. Проводка материала, приготовление гистологических срезов и окраска осуществлялись по обычной методике (гематоксилин-эозином, пикрофуксином по Ван-Гизону).

Статистическую обработку выполняли на основе принципов вариационной статистики с использованием пакета программ Statistika 5.0

Результаты. В динамике нормальной регенерации кожной раны (1 группа) выявлена двухфазная реакция со стороны нейтрофильных гранулоцитов. Первая фаза соответствует раннему послеоперационному периоду (1 – 3 сутки), проявляется нейтрофильным лейкоцитозом, снижением активности миелопероксидазы на 46% и отмечается тенденция к повышению СЦК ЛКБ. Данный период морфологически характеризуется заполнением раневого дефекта фибрином, среди нитей которого наблюдается большое количество сегментоядерных нейтрофилов, их пристеночное стояние и выход лейкоцитов из сосудов, отек тканей, что указывает на выраженную воспалительную реакцию. Вторая фаза отмечается на 7-10 сутки и отличается некоторым повышением активности миелопероксидазы на 45% от исходного и внутриклеточного содержания ЛКБ на 41 % ($p < 0,05$). В это время в области раны выраженность воспалительных изменений снижается, в зоне повреждения появляются признаки пролиферативной реакции. Раневой дефект выполнен новообразованной грануляционной тканью с большим количеством тонкостенных сосудов и клетками воспалительного инфильтрата. В ее основном веществе преобладают кислые ГАГ. С краев дефекта эпидермис утолщен за счет пролиферации клеток базального слоя и частично наползает на зону повреждения. В большом количестве представлены молодые фибробласты и появляется нежная сеть коллагеновых волокон.

Таким образом, на основании сопоставления лабораторных и морфологических данных можно полагать, что первая фаза изменения функционально-метаболического статуса нейтрофилов характеризует острую воспалительную реакцию при нанесении кожной раны, а вторая фаза отражает начало активации репаративных процессов.

Во второй группе животным вводили комплексный препарат ГАГ, который обладает способностью стимулировать регенерацию соединительной ткани. Выраженных изменений уровня ЛКБ и активности миелопероксидазы в этой ситуации нами не установлено. При морфологическом исследовании краев кожной раны в клеточном составе инфильтрата преобладают гистиоциты и фибробласты, лимфоциты, плазматические клетки. Грануляционная ткань отечна, о ее созревании свидетельствует соотношение кислых и нейтральных ГАГов в основном веществе, и наличие тонких коллагеновых волокон. В 50 % случаев в этот срок выявлено наползание на грануляционную ткань новообразованного эпителия. В контрольной группе животных случаев эпителизации раневого дефекта в этот срок не обнаружено, в краях раны идет утолщение эпителия

за счет пролиферации клеток базального слоя. Следовательно, «стимулированная» регенерация кожи характеризуется более интенсивными темпами пролиферации клеток эпидермиса, активацией синтеза компонентов межклеточного матрикса и формированием более нежного соединительнотканного рубца. Однако она не сопровождалась заметным изменением активности нейтрофилов.

Выводы. Показатели функционально-метаболической активности нейтрофильных гранулоцитов периферической крови (МП, ЛКТ) отражают системный воспалительный ответ при посттравматической регенерации кожи, но не имеют прямой бесспорной связи с активностью репаративного процесса.

ВЫСОКАЯ УСТОЙЧИВОСТЬ ФАКТОРА ИНГИБИРОВАНИЯ МИГРАЦИИ МАКРОФАГОВ (MIF) К СТРЕССОВЫМ ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИМ ВОЗДЕЙСТВИЯМ

Третьяков О.Ю., Коноплева М.В., Кохановская Н.А., Вовк В.А., Суслов А.П.

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

MIF обладает свойствами провоспалительного цитокина, имеет, как минимум, две ферментативные активности – таутомеразную и тиолоксидоредуктазную, а также является одним из наиболее эволюционно консервативных белков. Мы предполагаем (Суслов А.П., Коноплева М.В., Третьяков О.Ю. - Медицинская иммунология. - 2006. - т.8. - №1), что MIF относится к семейству белков, образующих в совокупности стрессовый протеом (Kultz D., 2005), который позволяет клетке выживать в самых экстремальных условиях. В настоящей работе высокоочищенные препараты MIF – природный, выделенный из головного мозга человека, или человеческий рекомбинантный, подвергали жестким физико-химическим воздействиям: высокий и низкий pH, высокая температура, хаотропные агенты. Исследовали все три основные активности MIF – ингибирование миграции макрофагов, кето-енол-изомеразную и тиолоксидоредуктазную. Мы установили, что MIF обладает уникальной устойчивостью к стрессовым физико-химическим воздействиям: практически полностью сохраняет функциональную активность в диапазоне pH 2,8 – 12, стабилен при прогреве до 70°C, нечувствителен к обработке 8 М мочевиной и 6 М гуанидином. Полученные данные свидетельствуют в пользу высказанного предположения о родстве MIF с белками стресс-протеома.

ХОЛИНЕРГИЧЕСКАЯ РЕГУЛЯЦИЯ РЕАКЦИИ ВОСПАЛЕНИЯ ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ЯЗВЕ ЖЕЛУДКА У КРЫС

Трубицына И.Е., Царегородцева Т.М., Чикунова Б.З., Серова Т.И., Рудь М.В.

ЦНИИ гастроэнтерологии, Москва, Россия

Парасимпатический отдел вегетативной нервной системы является одним из регуляторных механизмов возбудимости клеток эффекторных тканей реакции воспаления, которая возникает при экспериментальной «ацетатной» язве желудка. Не исключено, что парасимпатические (холинергические) влияния распространяются и на иммунологическую стадию воспаления. Активация Н - холинорецепторов при стимуляции периферических ветвей вагуса подавляет продукцию IL-1β, TNF-α и других провоспалительных цитокинов макрофагами. Стволовая ваготомия повышает продукцию TNF-α.

Цель: исследовать эффекты стимуляции и блокады М-холинорецепторов на воспалительную реакцию в слизистой оболочке желудка крыс.

Материал и методы: работа выполнена на 40 белых крысах-самках Wistar, массой 180-200 г. Животным воспроизводили «ацетатную» экспериментальную язву желудка (ЭЯЖ). Используемые препараты: атропин (2 мг/кг), ингибитор ацетилхолинэстеразы прозерин (0,02 мкг/кг), ацетилхолин (5 мг/кг) вводили внутрибрюшинно, растворитель – инъекционная вода. Препараты вводили по следующим схемам: 1) ежедневно, начиная с первых суток; 2) через 18 - 24 ч после воспроизведения ЭЯЖ; 3) с 5-х суток после воспроизведения ЭЯЖ. Животных забивали через 24 часа ЭЯЖ + 3 часа после введения препаратов, на 10 сутки после воспроизведения ЭЯЖ и ежедневного введения препаратов с 1-х и 5-х суток. Желудок извлекали из брюшной полости, вскрывали и проводили ревизию слизистой оболочки, выявляя повреждения, определяли язвенный индекс (ЯИ) ЭЯЖ (площадь язвенного дефекта, $см^2$).

Результаты. Определение биологически активных веществ (БАВ) в динамике развития и заживления ЭЯЖ показало, что в часовые сроки до 18 часов основную роль в развитии воспалительной реакции играют биогенные амины – серотонин и гистамин. Через 48 часов ЭЯЖ повышается уровень IL-1β. К 7 суткам снижается концентрация IL-1β и повышается IL-4. Введение животным атропина через 24 часа ЭЯЖ уменьшает ЯИ, введение ацетилхолина или прозерина увеличивает ЯИ. Ежедневное (с 1х суток) введение атропина, прозерина или ацетилхолина одинаково недостоверно замедляло заживление язвенного дефекта. Введение атропина до 5-х суток или ацетилхолина и прозерина с 5-х суток способствовало заживлению язвенного дефекта ($p<0,05$). Таким образом, введение холинолитика в первые часы воспаления уменьшает отек, гиперемию и сосудистую реакцию. В более поздние сроки холиномиметики способствуют заживлению язвенного дефекта.

ПРИМЕНЕНИЕ ИММУНОМОДУЛИРУЮЩИХ ПРЕПАРАТОВ ВИТУЛИНА И ТУЛИМКАРА ПРИ ТЕРАПИИ НОВООБРАЗОВАНИЙ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ У ЖИВОТНЫХ

Тулева Н.П., Тулев Ю.В., Граубергер Н.А., Ледовских В.А., Лосев Н.А.

Медико-биологическое объединение «ТУЛИМ», ГУ НИИ экспериментальной медицины РАМН, Санкт-Петербург, Россия

В ветеринарной клинической практике большую долю пациентов составляют животные с различными новообразованиями. Наиболее часто встречаются опухоли молочных желез у собак (нестерилизованных самок).

Этиологию возникновения этих заболеваний составляют множество факторов, одним из которых является нарушение гормонального фона. Поэтому поиск более эффективных противоопухолевых средств является весьма актуальным. Под наблюдением находилось 28 животных. В качестве противоопухолевых средств использовали иммуномодулирующие препараты витулин и тулимкар содержащие биологически активные вещества, производные флавона, флавонола

и флавонона, полученные из цветков, вегетативной и корневой частей растений посредством использования пчел. По характеру течения опухолевого процесса и общему состоянию животные были разделены на две группы, В первую группу входили более молодые особи на ранних стадиях заболевания, а во вторую – более старые на поздних стадиях заболевания. Животные первой группы подвергались хирургическому вмешательству по поводу экстирпации опухоли с последующим комплексом стандартной терапии. Постоперационный период протекал тяжело, нередко возникало метастазирование опухоли. В случае применения витулина в комбинации с тулимкаром за 25-30 суток до операции в дозе 0,5 мг/кг массы внутримышечно 1 раз ежедневно в течение 4-6 дней, а затем 1 раз в 2-3 дня в течение 3-4 недель, при этом всё время чередуя введение препаратов, опухоль, на этом фоне терапии, уменьшалась в размере, приобретая более четкие очертания, и становилась подвижной, что способствовало более легкой экстирпации во время хирургической операции. В постоперационный период животные получали второй курс терапии витулином с тулимкаром с целью предупреждения развития метастазов опухоли. Пост операционный период на этом фоне протекал более благоприятно без выраженного проявления интоксикации. В дальнейшим, в зависимости от состояния, животные получали профилактический курс поддерживающей терапии чередуя препараты 1 раз в 2 дня в течение 3-4 недель повторяя курс 2 раза в год. У 95% животных рецидивов болезни не наблюдалось в течение 5-6 лет наблюдения. В поздних стадиях заболевания, когда новообразование было больших размеров, не имело четких контуров и было с измененными лимфоузлами, хирургическое вмешательство часто имело неблагоприятные последствия в виде быстрого метастазирования в легкие, выраженной интоксикации и частой гибели животных, несмотря на проведение стандартной противоопухолевой терапии. В случае проведения активной иммунотерапии витулином с тулимкаром в сочетании со стандартной терапией постоперационный период протекал более легко, поскольку эти препараты, кроме противоопухолевого эффекта, обладают антиоксидантным, гепатопротекторным, противовирусным, противовоспалительным, антимикробным и антипролиферативным действием. Применение витулина с тулимкаром у неоперабельных животных улучшало их общее состояние и позволяло продлить жизнь до 8-12 лет. Таким образом. Можно заключить, что применение препаратов Витулин и Тулимкар при новообразованиях молочной железы является оправданным и целесообразным. Не исключена возможность использования этих препаратов при новоообразованиях молочной железы у женщин.

НЕГАТИВНАЯ СЕЛЕКЦИЯ γδ Т-ЛИМФОЦИТОВ, НЕСУЩИХ ЦЕПЬ Vγ5

Турчинович Г.Б. [1,3], Eichmann К.[1], Кроткова А.[2],Тарасова Е.[3], Nerz G.[1], Wuerch A.[1]

[1]Max-Planck-Institute of Immunobiology, Freiburg, Germany;

[2]Institute of Molecular Physiology, University of Bonn, Germany;

[3]Институт экспериментальной медицины РАМН, Санкт-Петербург, Россия

Два класса Т-лимфоцитов, αβ и γδ, возникают в тимусе из общего предшественника. Гены цепей δ, γ и β Т-клеточного рецептора (TCR) перестраиваются в фазах DN2 и DN3. После VDJ-перестройки гена TCRβ DN3-клетки приобретают пре-TCR в виде комплекса CD3 с цепью TCRβ и инвариантной суррогатной α-цепью, называемой пре-Tα. Цепи TCR γ и δ появляются на стадии DN4, когда популяция состоит из клеток с 4 типами TCR: β+γδ-, β-γδ+, β+γδ+ и β-γδ-. Линия αβ Т-лимфоцитов развивается из β+γδ- DN4-клеток путем созревания в CD4/CD8 двойные позитивные (DP) клетки, в которых перестраиваются гены TCRα, а цепь pre-Tα заменяется клонотипическими полипептидными цепями, что дает зрелый αβ TCR. Линия γδ развивается из β-γδ+ и β+γδ+ DN4-клеток; β-γδ- DN4-клетки гибнут путем апоптоза. Распределение γδ Т-клеток в организме зависит от Vγ-элемента их TCR. Клетки с цепями Vγ3 и Vγ4 заселяют, главным образом, слизистую оболочку гениталий самок, с Vγ1.1, Vγ2 – периферические лимфоидные органы, с Vγ5 – кишечный эпителий, где входят в популяцию интраэпителиальных лимфоцитов.

В настоящем исследовании мы показали, что цепь пре-Tα оказывает влияние на развитие γδ Т-лимфоцитов, экспрессирующих цепь Vγ5. Vγ5-позитивные Т-клетки возникают преимущественно в тимусе, а не в кишечном эпителии, как считалось, т.к. у мышей nu/nu интраэпителиальных лимфоцитов с Vγ5-цепью очень мало. В отличие от других γδ Т-клеток, мы выявили выраженное угнетение продуктивных перестроек цепи Vγ5 среди незрелых клеток тимуса. Угнетение зависело не от генов TCRδ, а от цепи пре-Tα. Это указывает на то, что в негативной селекции в тимусе участвует не весь γδ Т-клеточный рецептор, а лишь цепи Vγ5 и пре-Tα.

Мы обнаружили, что пре-Tα цепь не влияет на развитие клеток этого типа, т.к. накопление of Vγ5-клеток в кишечнике не нарушается у мышей с нокаутом пре-Tα. Негативная селекция Vγ5-клеток в тимусе не является условием их поступления в кишечник. Выделив из тимуса Vγ5-позитивные γδ Т-клетки, мы показали, что они могут селиться в кишечнике мышей с нокаутом of Rag/γc, не способных к перестройке генов γ-цепи. Vγ5-клетки способны развиваться из тимоцитов *in vitro*, в отсутствие негативной селекции, что подтверждает гипотезу о том, что наиболее незрелые Vγ5-клетки не гибнут, а эмигрируют из тимуса.

Vγ5-позитивные γδ Т-клетки в кишечнике обладают репертуаром, возникшим и отобранным в тимусе. По сравнению с тимусом, CDR3-районы цепи Vγ5 интраэпителиальных лимфоцитов укорочены и менее гетерогенны по аминокислотной последовательности. Выделенные тимические Vγ5-позитивные γδ Т-клетки подвергаются такому же репертуарному отбору и в том случае, когда их вводят мышам с нокаутом Rag/γc. Это доказано путем реизоляции этих клеток из кишечника мышей-реципиентов. Взаимодействуют ли цепи Vγ5 и пре-Tα друг с другом физически, и соединен ли гипотетический пре-γδ-TCR с комплексом CD3 на клеточной поверхности не известно. Показано, однако, что цепь пре-Tα способна комплексироваться с другими TCRγ-цепями, в частности, с Vγ2.

БИОЛОГИЧЕСКОЕ ДЕЙСТВИЕ ЦИРКУЛИРУЮЩИХ ИММУННЫХ КОМПЛЕКСОВ В НОРМЕ И ПРИ ПАТОЛОГИИ

Тярасова К.Г., Ситкевич Р.В., Соловцова И.Л., Соловьева М.А., Галебская Л.В., Паукер М.Н.

Санкт-Петербургский медицинский университет им. акад.И.П.Павлова, Россия

Иммунные комплексы (ИК) присутствуют в крови здоровых людей и пациентов, страдающих различными

заболеваниями. Ряд исследований свидетельствуют о том, что содержание ИК в кровеносном русле не отражает тяжести и специфики патологического процесса. Поэтому полагаем, что более перспективным является определение не только концентрации ИК в крови, а их функциональных свойств. С помощью метода преципитации ПЭГ-ом выделяли циркулирующие ИК из донорской сыворотки здоровых людей и пациентов с впервые выявленным туберкулезом. Исследовали влияние стандартных концентраций ИК на параметры гемолитической активности системы комплемента человека. Обнаружена линейная зависимость степени ингибирования альтернативного пути активации комплемента (АПК) и реактивного лизиса. Это позволяет сделать заключение о том, что степень ингибирования АПК и реактивного лизиса иммунными комплексами определяется индивидуальными особенностями комплемента сыворотки крови, а не свойствами ИК. В классическом пути активации комплемента (КПК) нами были обнаружены различия во влиянии ИК на комплемент-зависимый гемолиз в норме и при патологии. Иммунные комплексы здоровых доноров вызвали увеличение индукционного периода и замедление комплементзависимого гемолиза. Характер зависимости эффекта от дозы ИК отличался индивидуальными особенностями, но всегда действие ИК было ингибирующим. Иммунные комплексы, полученные из плазмы крови больных с впервые выявленным туберкулезом легких проявляли себя по-другому, а именно, они уменьшали (иногда практически до нуля) величину индукционного периода, а скорость комплементзависимого гемолиза, хотя и тоже (как в норме) снижали, но в гораздо меньшей степени, чем ИК здоровых людей. Таким образом, гемолитическая система комплементзависимого гемолиза позволяет оценивать биологические свойства разных ИК.

ГЛАВНЫЙ КОМПЛЕКС ГЕНОВ ИММУННОГО ОТВЕТА ЧЕЛОВЕКА, НОВЫЕ ДАННЫЕ И ПЕРСПЕКТИВЫ

Хаитов Р.М., Алексеев Л.П.

ГНЦ «Институт Иммунологии ФМБА России»

Открытому в конце 60-х годов XX века и наиболее полно изученному к настоящему времени из числа сложных генетических систем человека главному комплексу тканевой совместимости (HLA) принадлежит первостепенная роль в регуляции иммунного ответа. В настоящее время не вызывает сомнения то, что система HLA, являясь наиболее полиморфной генетической структурой человека (более 2000 аллельных вариантов), может обоснованно считаться главным комплексом генов иммунного ответа человека. Как «классические», так и вновь открытые гены HLA обеспечивают все этапы адаптивного иммунитета от процессинга и презентации иммуногенных пептидов до запуска и реализации самого иммунного ответа. Одновременно с этим продукты генов HLA принимают участие в реализации врожденного иммунитета человека. Уникальным свойством системы HLA является ее способность поддержания высокого уровня генетического полиморфизма организма, включая полиморфизм самой системы HLA. Эта важнейшая биологическая функция обеспечивается как на уровне генетического контроля репродуктивного процесса, так и на уровне обеспечения преимуществ HLA-гетерозиготных организмов над HLA-гомозиготами. Нарушение «нормальной» физиологической функции генов HLA и их продуктов - HLA-антигенов ведет к развитию ряда патологических состояний. Одновременно с этим молекулярная основа и связанная с ней третичная структура ряда HLA антигенов определяет тот факт, что они могут являться генетическими маркерами и индукторами развития ряда заболеваний. Переход практического HLA-типирования на молекулярно-генетический уровень резко расширил возможности практической медицины в таких областях как клиническая трансплантология, аутоиммунные и онкологические заболевания. Внедрение достижений в области молекулярной генетики HLA открывают новые перспективы не только в диагностике, но и в профилактике и лечении целого ряда социальнозначимых заболеваний, а также в развитии таких новых направлений медицины, как использование клеточных технологий и генофармакологии.

ВЛИЯНИЕ ПОЛИОКСИДОНИЯ НА РЕГЕНЕРАЦИЮ ТКАНЕЙ С РАЗНОЙ ВОССТАНОВИТЕЛЬНОЙ СПОСОБНОСТЬЮ

Храмцова Ю.С., Юшков Б.Г.

Институт иммунологии и физиологии УрО РАН, Екатеринбург, Россия

Все известные на сегодняшний день иммунокорректоры изучены с точки зрения их влияния на показатели иммунного статуса. Данные, касающиеся влияния их на морфогенетическую функцию, немногочисленны. В то же время, использование этих препаратов может помочь предложить принципиально новые пути для стимуляции восстановительных процессов.

Цель: изучить влияние полиоксидония на регенерацию тканей с разной восстановительной способностью.

Методы. Опыты проводились на беспородных крысах-самцах массой 180-230 г. Полиоксидоний вводили однократно внутримышечно за 1 час до оперативного вмешательства в дозе 0,1 мг/кг. Регенерацию печени индуцировали удалением 2/3 массы органа и оценивали по морфологическим и гистологическим показателям. Регенерацию крови вызывали острой массивной кровопотерей (2% от массы тела) и ее оценку проводили по показателям периферической крови и костного мозга. Через 4 или 17 часов после воздействия из селезенки и тимуса готовили взвесь клеток в среде 199 по методу Краскиной Н.А. и трансплантировали реципиентам в хвостовую вену по 60-80 х 10^6 клеток. Регенерационные процессы в печени или эритропоэз у реципиентов изучали через 48 часов. Статистический анализ результатов проводили с использованием параметрического *t*-критерия Стьюдента.

Результаты. Стимуляция иммунной системы полиоксидонием существенно влияет на репаративную регенерацию независимо от вида поврежденной ткани и этот эффект наиболее выражен по отношению к тому типу регенерации, который преобладает в ней. Важным показателем восстановления органа является изменение его массы, о чем судили в случае печени по массе регенерата, а в отношении кроветворной ткани – клеточности костного мозга бедренной кости. При стимуляции иммунной системы полиоксидонием масса сохраненной печени в деструктивно-реактивную фазу регенерации в отличие от контроля не только не уменьшается, но даже возрастает, а клеточность костного мозга через 17 часов после кровопотери превышает показатель животных, не получавших препарат. В качестве ключевых показателей внутриклеточной регенерации исследователи признают ядерно-цитоплазма-

тический индекс и наличие двуядерных клеток, а клеточной – митозов. При оценке регенераторных процессов было обнаружено, что после резекции печени при стимуляции иммунной системы усиливается преимущественно внутриклеточный тип, о чем свидетельствует резкое увеличение количества двуядерных клеток, в то время как в костном мозге активируется главным образом клеточный тип регенерации – отмечается более выраженные гиперплазия эритроидного и гранулоцитарного ростков и более ранний ретикулоцитоз. Установлено, что лимфоциты животных доноров, леченных полиоксидонием, приобретают способность в большей степени активировать процессы внутриклеточной регенерации печени у реципиентов, о чем свидетельствует увеличение размеров ядер (спленоциты) и числа двуядерных клеток (спленоциты и тимоциты). В случае же кровопотери лимфоидные клетки уже на ранние сроки (4 часа) способны активировать эритропоэз у реципиентов, о чем свидетельствует развитие ретикулоцитоза и гиперплазия эритроидного ростка, в отличие от контрольных лимфоидных клеток.

Заключение. Активация иммунной системы полиоксидонием приводит к ускорению процессов регенерации независимо от типа поврежденной ткани.

ОСОБЕННОСТИ ИММУНОТРОПНЫХ ЭФФЕКТОВ ХРОНИЧЕСКОГО СТРЕССА У НОРМОТЕНЗИВНЫХ И ГИПЕРТЕНЗИВНЫХ КРЫС

Цейликман В.Э., Козочкин Д.А., Маркель А.Л., Григорьев И.И., Цейликман О.Б., Синицкий А.И., Бубнов Н.В., Лавин Е.А.

Челябинская государственная медицинская академия, Челябинск, Россия;

НИИ Цитологии и генетики, Новосибирск, Россия

Известно, что при гипертонической болезни наблюдаются иммунологические расстройства. Их развитие может быть следствием иммуносупрессивного действия глюкокортикоидов, играющих заметную роль в патогенезе артериальной гипертензии. Ранее нами было показано, что у нормотензивных крыс при повторных воздействиях одночасовых иммобилизаций снижение чувствительности лимфоидных органов к гипоплазирующему действию глюкокортикоидов сопряжено с постстрессорным усилением иммунного ответа (Цейликман В.Э.,1998). У гипертензивных крыс линии НИСАГ повторные иммобилизации усиливали чувствительность лимфоидных органов к гипоплазирующему действию глюкокортикоидов. Целью настоящего исследования являлось сопоставление межлинейных различий у стрессированных нормотензивных и гипертензивных крыс к иммунизации аллогенными эритроцитами.

Исследование было выполнено на 80 крысах линий Вистар и НИСАГ. Животные были подвергнуты трёхкратному 1-часовому иммобилизационному стрессу с интервалом между воздействиями в 24 часа. Через 24часа после завершения последнего стрессорного эпизода животные были внутрибрюшинно иммунизированы эритроцитами барана в дозе 10^7 клеток на 1 г массы тела. Через четверо суток после иммунизации в подушечку задней лапы животного инъецировали разрешающую дозу антигена в количестве 10^7 ЭБ/ 1 г массы, при этом в контралатеральную лапу вводили эквиобъёмное количество изотонического раствора NaCl. Реакцию оценивали волюмометрически через 24 часа после введения разрешающей дозы эритроцитов барана. В отдельной серии экспериментов через 24 часа после завершения стрессорных воздействий у животных определяли уровень циркулирующих IL-1, IL-6 и кортикостерона.

Установлено, что у стрессированных гипертензивных крыс концентрация циркулирующего IL-6 была достоверно выше, а концентрация кортикостерона достоверно ниже, чем у стрессированных нормотензивных крыс. Несмотря на более низкий уровень IL-6 для нормотензивных крыс, отмечено усиление клеточного иммунного ответа, что проявлялось в увеличении интенсивности реакции ГЗТ. Это хорошо согласуется с полученными ранее данными о повышенной чувствительности к действию рекомбинантного IL-1β у стрессированных нормотензивных крыс. Для стрессированных гипертензивных крыс характерно снижение интенсивности ГЗТ. Вероятно, наблюдаемая иммуносупрессия связана не только с повышенной чувствительностью к глюкокортикоидам но и со сниженной чувствительностью к цитокинам.

Таким образом, в ответ на одно и то же стрессорное воздействие у нормотензивных и гипертензивных крыс чувствительность к антигенной стимуляции меняется на альтернативную.

Это исследование выполнено при поддержке гранта РФФИ-Урал № 04-04-96097.

ИММУНОХИМИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ЧЕЛОВЕЧЕСКОГО СЫВОРОТОЧНОГО γ-ГЛОБУЛИНА, МОДИФИЦИРОВАННОГО ЦИНКОМ И МЕДЬЮ

Чекнёв С.Б., Бабаева Е.Е., Денисова Е.А., Воробьёва У.А., Монгуш Э.М.

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

Введение. Известно, что конформационные преобразования биомакромолекул могут способствовать экспрессии ими новых антигенных детерминант, проявлению новой антигенной специфичности и изменению эффекторных функций. Одним из факторов, вызывающих указанные конформационные перестройки, выступают катионы металлов, взаимодействие которых с белками обусловливает «возникновение принципиально новых физических возможностей для организации функциональных процессов».

Целью исследования явилось получение образцов модифицированного медью и цинком человеческого сывороточного γ-глобулина с последующей их иммунохимической характеристикой.

Методика исследования предполагала связывание катионов меди и цинка с приготовленным в 0,15 М растворе NaCl (pH 7,15-7,19) препаратом γ-глобулина (ICN) в течение 1 час при 37°С; удаление свободного металла молекулярной ультрафильтрацией на конусах CF-25 (Amicon); определение содержания не связавшихся с белком меди и цинка по реакции с диэтилдитиокарбаматом натрия и о-фенантролином соответственно; восстановление образцов γ-глобулина в исходном объеме. Конформационное состояние белка на всех этапах исследования оценивали спектрофотометрически в ультрафиолете, в диапазоне длин волн от 190 до 320 нм, с использованием дифференцирующего спектрофотометра PU 8730 UV/VIS (Philips). Иммунохимическую характеристику образцов осуществляли в реакциях радиальной иммунодиффузии по Ман-

чини и Оухтерлони с козьими антителами против IgG (H+L) человека (Медгамал), а также в прямом и «сэндвич» вариантах иммуноферментного анализа (ИФА) с меченными пероксидазой кроличьими анти-IgG (H+L) человека антителами (Медгамал). В качестве субстрата в ИФА применяли ортофенилендиамин; реакцию учитывали с использованием ELISA Processor II (Behring).

Основные результаты. В работе установлено, что связавший определенные количества металла γ-глобулин отличается от контрольного белка повышенной компактностью упаковки. При этом гипохромный эффект цинка превосходит действие меди в длинноволновой области спектра поглощения белка; в коротких длинах волн влияние цинка не регистрируется, а медь вызывает гипохромию. Иммунодиффузия обнаруживает возможность закрытия в результате связывания металла части антигенных детерминант γ-глобулина (снижение интенсивности преципитации) и не выявляет изменений, указывающих на присутствие новых антигенных детерминант, определяемых в использованной системе оценки. ИФА подтверждает полученные данные и позволяет количественно охарактеризовать различия между образцами γ-глобулина, модифицированного медью и цинком.

Заключение. Связывание катионов меди и цинка с γ-глобулином в условиях, приближенных к физиологическим, вызывает существенные конформационные преобразования молекулы белка, но, по-видимому, не приводит к изменению ее антигенной специфичности.

ПЕРСПЕКТИВЫ КЛИНИЧЕСКОГО ИСПОЛЬЗОВАНИЯ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК ВЗРОСЛОГО ЧЕЛОВЕКА

Черных Е.Р., Старостина Н.М., Леплина О.Ю., Шевела Е.Я., Останин А.А, Козлов В.А.

ГУ НИИ клинической иммунологии СО РАМН, Новосибирск, Россия

Изучение роли стволовых клеток (СК) в регенерации органов и тканей и разработка на этой основе новых технологий лечения является той сферой, которая вызывает сегодня наибольшее количество дебатов. Это связано с рядом нерешенных фундаментальных проблем, а также с вопросами этического и юридического характера. Тем не менее, данное направление, получившее название регенераторной медицины, интенсивно развивается и именно с этим направлением многие эксперты связывают перспективы завтрашней медицины. Согласно существовавшим ранее представлениям постнатальные стволовые клетки, будучи частью органоспецифических клеток сформированного родившегося организма характеризуются ограниченным дифференцировочным потенциалом (обычно в пределах органов и тканей своей локализации). Однако за последние годы выяснилось, что СК взрослого человека, включая стволовые кроветворные клетки, сохраняют заложенный потенциал полипотентности, что позволяет им преодолевать границы той или иной линии, ткани и даже зародышевого листка. Данный феномен получил название пластичности СК. Пластичность описана для кроветворных и мезенхимальных СК костного мозга, а также для некоторых видов тканевых СК. Так, мезенхимальные стволовые клетки костного мозга могут дифференцироваться в клетки тканей экто- и эндодермального происхождения, например, нервную ткань, эпителиальные клетки печени и т.д. Аналогичным образом описана способность кроветворных СК дифференцироваться в эпителиальные, мышечные клетки и т.д. Кроме того, выяснилось, что СК костного мозга могут мигрировать в кровоток и пополнять пул тканевых СК. Механизмы пластичности остаются во многом неизученными, однако сам факт пластичности и возможности СК к миграции позволили сформировать концепцию о важной роли СК в регенерации не только кроветворной, но и негемопоэтических тканей. Соответственно, активно обсуждается идея о том, что постнатальные СК могут быть столь же успешно использованы в регенераторной медицине как эмбриональные или фетальные СК, причем минуя проблемы этического характера. В последние 5 лет в ГУ НИИКИ СО РАМН интенсивно изучаются количественные и функциональные параметры СК костного мозга в норме и при патологии. Кроме того, к настоящему времени завершены пилотные клинические исследования по использованию аутологичных СК костного мозга в качестве заместительной клеточной терапии при лечении различных заболеваний (хронических диффузных заболеваний печени, последствий ишемического и геморрагического инсульта, травматической болезни спинного мозга, атрофических заболеваний заднего полюса глаза, ишемии нижних конечностей). Показана безопасность и хорошая переносимость терапии с использованием СК. Обсуждаются вопросы клинической эффективности данных подходов и перспективы дальнейшего развития клеточных технологий в указанном направлении.

ПОСЛЕДСТВИЯ ГРИППОЗНОЙ ИНФЕКЦИИ И ПРОТИВОГРИППОЗНОЙ ВАКЦИНАЦИИ У МЫШЕЙ С ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНО ИНДУЦИРОВАННЫМ АЛЛЕРГИЧЕСКИМ ВОСПАЛЕНИЕМ РЕСПИРАТОРНОГО ТРАКТА

Чиркова Т.В., Найхин А.Н.

НИИ экспериментальной медицины РАМН, Санкт-Петербург, Россия

В России в последние десятилетия отмечен бурный рост IgE-опосредованных аллергических заболеваний, среди которых значительную часть составляют аллергопатологии нижних отделов респираторного тракта (бронхиальная астма, хронические обструктивные бронхиты аллергической этиологии). Доказано, что фактором, индуцирующим рецидивы и осложнения таких аллергических заболеваний, является вирус гриппа. Об этом убедительно свидетельствует факт резкого увеличения во время эпидемии частоты случаев госпитализации лиц, страдающих бронхиальной астмой. Поэтому именно данная категория людей особо нуждается в защите от гриппа, поскольку инфекция у них сопровождается тяжелыми осложнениями со стороны респираторного тракта. Вакцинопрофилактика гриппа и безвредность противогриппозных вакцин для этой категории людей остается актуальной проблемой современной вакцинологии. Американскими авторами показано, что иммунизация инактивированной гриппозной вакциной лиц, страдающих бронхиальной астмой, не сопровождается негативными последствиями. Как влияет на аллергический статус таких людей иммунизация живой реассортантной гриппозной вакциной (ЖГВ), содержащей хотя и аттенуированный вирус, но в репликативной форме, остается неизвестным. Однако на начальном этапе исследование данного вопроса возможно только в условиях эксперимента.

Цель исследования: на модели бронхиальной астмы мышей оценить аллергоиммунологические последствия

гриппозной инфекции и противогриппозной вакцинации.

Задачи исследования. (I) Отработать модель воспроизведения овальбумин-индуцированной бронхиальной астмы (OVA-БА) у мышей (стадия ремиссии). (II) Оценить у таких мышей после иммунизации вирусами гриппа: а) гуморальный иммунный ответ (продукция общих, аллергенспецифических и вирусспецифических IgE и IgG); б) клеточный иммунный ответ (пролиферативная активность лимфоцитов селезенки и регионарных респираторных лимфоидных органов); в) морфофункциональные изменения тканей респираторного тракта.

Схемы опыта. (I) Мыши с OVA-БА иммунизировались патогенным для них вирусом гриппа A/PR/8/34 (H1N1) (ПВ) и аттенуированным реассортантом (АР) – экспериментальным аналогом вакцинного штамма для ЖГВ: через 48 часов (схема ***а***) и 10 дней (схема ***б***) после заключительной инокуляции OVA. (II) OVA-БА воспроизводилась у мышей на различных стадиях течения постинфекционного и поствакцинального периодов.

Материалы и методы. *Экспериментальные животные:* мыши линии СВА. *Объекты исследования:* сыворотки крови, лимфоциты селезенки, назоассоциированной лимфоидной ткани и легких. *Методы исследования:* иммуноферментный анализ (определение IgG- и IgE-антител), МТТ-тест (реакция бласттрансформации лимфоцитов), гистологическая оценка морфофункциональных изменений в легких мышей.

Основные результаты. Инфицирование животных ПВ по схеме ***а*** приводило к резкому повышению уровней IgE, а в условиях схемы ***б*** увеличение продукции IgE наблюдалось лишь после дополнительного введения аллергена. В отличие от патогенного вируса АР не стимулировал продукцию OVA-специфических IgE ни в схеме опыта ***а***, ни в схеме ***б***. При этом оба вируса активно стимулировали продукцию OVA-специфических IgG. Во всех исследованных ситуациях не отмечена секреция вирусспецифических IgE. Обнаружены отличия в уровне синтеза OVA-специфических IgE и IgG при индукции OVA-БА на разных сроках поствакцинального и постинфекционного периодов.

Заключение. Полученные результаты свидетельствуют в пользу того, что в условиях экспериментально индуцированного аллергического воспаления респираторного тракта иммунизация аттенуированным реассортантным вирусом не представляет угрозы с точки зрения формирования негативных аллергоиммунологических последствий. Представленные экспериментальные данные могут послужить отправной точкой для обоснования подходов к противогриппозной вакцинации людей, страдающих аллергическими патологиями дыхательных путей.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ЖИЗНЕСПОСОБНОСТИ ДЕНДРИТНЫХ КЛЕТОК ПОСЛЕ КРИОКОНСЕРВАЦИИ

Чкадуа Г.З., Борунова А.А., Заботина Т.Н., Вишнякова Л.Ю., Огородникова Е.В., Кадагидзе З.Г., Барышников А.Ю.

ГУ РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН, г. Москва

Во многих научных центрах мира противоопухолевые вакцины на основе дендритных клеток (ДК) проходят различные фазы клинических исследований и в последнее время находят более широкое применение в клинике. В связи с тем, что вакцинотерапия предполагает многократное введение дендритных клеток, то получать ДК для очередной вакцинации можно либо каждый раз заново и, таким образом, вводить пациенту «свежие» дендритные клетки, либо сразу получить большое количество ДК, разделить их на аликвоты, криоконсервировать и использовать по мере надобности. При использовании последнего подхода необходимо быть уверенным, что после криоконсервации дендритные клетки остаются жизнеспособными и не меняют своих характеристик, в частности иммунофенотип.

Целью данного исследования явилось определение жизнеспособности и иммунофенотипа дендритных клеток после криоконсервации.

Материалы и методы. Дендритные клетки получали из моноцитов периферической крови, для этого из лейкомассы здоровых доноров выделяли мононуклеары периферической крови (МПК) при помощи центрифугирования в градиенте плотности Ficol-Hepaque ($\rho = 1{,}077$). После серии отмывок от фикола и тромбоцитов МПК наносили на пластиковые чашки Петри исходя из соотношения $50x10^6$ клеток в 10 мл культуральной среды. После адгезии моноцитов на пластик удаляли не прикрепленные клетки (лимфоциты), а моноциты культивировали в культуральной среде, содержащей 2% сыворотки человека и ростовые факторы: GM-CSF и IL-4. Через 5 суток производили полную замену среды на свежую и в культуру вносили индукторы дифференцировки (TNFα и $ПГЕ_2$). Спустя 48 часов собирали свободноплавающие дендритные клетки. Одну часть клеток использовали для определения исходного иммунофенотипа и жизнеспособности, тогда как другую часть клеток подвергали криоконсервации. Дендритные клетки криоконсервировали по методике, разработанной Мхеидзе Д.М. и используемой в банке криоконсервированных биоматериалов РОНЦ РАМН. Осадок клеток ресуспендировали в замораживающей среде (95% полиглюкин и 5% ДМСО), и ампулы в контейнере помещали в пары азота, через 1,5-2 часа клетки переносили в жидкий азот. Замороженные дендритные клетки размораживали, ампулу с клетками центрифугировали на микроцентрифуге в течение 2 минут. Далее осадок клеток ресуспендировали в PBS, содержащем 1% человеческого альбумина, и оставляли ДК при комнатной температуре в течение 1 часа, после чего определяли иммунофенотип и жизнеспособность клеток. Иммунофенотип ДК определяли с помощью реакции иммунофлуоресценции, для этого использовали моноклональные антитела к поверхностным антигенам, конъюгированные с ФИТЦ или ФЭ (CD80, CD83, CD86) и соответствующие изотипические контроли. Для определения степени экспрессии поверхностных антигенов на дендритных клетках значение средней интенсивности флуоресценции антигена делили на значение средней интенсивности флуоресценции соответствующего изотипического контроля. Жизнеспособность дендритных клеток определяли по окрашиванию клеток Annexin-V, конъюгированного с ФИТЦ. Анализ иммунофенотипа и жизнеспособности дендритных клеток проводили на проточном цитофлуориметре FACSCan.

Результаты. По окончании культивирования дендритные клетки обладали зрелым иммунофенотипом, что выражалось в экспрессии маркера CD83 и костимуляторных молекул CD80 и CD86. Исходное содержание мертвых клеток не превышало 10%. После размораживания криоконсервированных дендритных клеток и нахождения их в течение 1 часа при комнатной температуре экспрессия поверхностных антигенов практически не менялась и

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ДОЛИ МЕРТВЫХ КЛЕТОК И СРАВНЕНИЕ ЭКСПРЕССИИ ПОВЕРХНОСТНЫХ АНТИГЕНОВ НА СВЕЖИХ И КРИОКОНСЕРВИРОВАННЫХ ДЕНДРИТНЫХ КЛЕТКАХ

Исследуемые параметры	CD80 (MFI)	CD83 (MFI)	CD86 (MFI)	% мертвых клеток
Свежие ДК (n = 4)	12,9 ± 3,3	9,8 ± 0,5	96,8 ± 4,2	8 ± 1,0
ДК после разморозки (n = 4)	14,2 ± 0,6	7,3 ± 1,1	99,5 ± 10,3	14,3 ± 1,2

оставалась на том же уровне. При этом незначительно возрастало количество мертвых клеток, содержание которых не превышало 20% (таблица).

Вывод. Используемая методика криоконсервации дендритных клеток позволяет сохранять клетки без изменения экспрессии основных поверхностных антигенов, при этом жизнеспособность ДК остается на высоком уровне.

АКТИВНОСТЬ РЯДА ЗАЩИТНЫХ ФУНКЦИЙ ОРГАНИЗМА ПРИ СИНДРОМЕ ХРОНИЧЕСКОЙ УСТАЛОСТИ В ЭКСПЕРИМЕНТЕ

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

ГУ НИИ экспериментальной медицины РАМН, Санкт-Петербург, Россия

Синдром хронической усталости как новая нозологическая единица оформился в конце 80-х годов XX века. Несмотря на проводимые в последние годы интенсивные исследования, этиология синдрома хронической усталости остается спорной. Наиболее вероятные причины его развития – вирусные инфекции, иммунологические дисфункции, психоневрологические расстройства. По современным представлениям, развитие синдрома хронической усталости приводит к дисфункции иммунной системы, одним из механизмов которой является нарушение взаимодействия нейроэндокринной и иммунной систем. Эти нарушения реализуются как на уровне изменения активности иммунокомпетентных клеток, так и непосредственно на мембранах клеток головного мозга. Целью работы было исследование изменения уровня кортикостерона (Cs) в плазме крови крыс, цитотоксической активности натуральных киллерных (NK) клеток селезенки, а также трансдукции сигнала IL-1β по сфингомиелиновому пути, оцениваемую по изменению активности мембранного фермента нейтральной сфингомиелиназы (Н-СМазы) в коре головного мозга крыс, при развитии иммунологически индуцированной синдромом хронической усталости, вызванной введением животным препарата синтетической двуцепочечной РНК (Poly I:C).

Препарат Poly I:C (Amersham, UK) вводили крысам-самцам Wistar в/бр. в дозе 3 мг/кг массы животного. Через 1, 2, 24 часа и на 3-и, 5-е и 7-е сутки после введения препарата собирали кровь животных для определения уровня Cs методом радиоиммунологического анализа и выделяли мембранную фракцию Р2 из коры головного мозга крыс. Цитотоксичность спленоцитов в отношении клеток К562 определяли на 3-и сутки после введения Poly I:C. Установлено увеличение концентрации Cs в сыворотке крови крыс через 2 часа после введения Poly I:C, которая возвращалась к базальному уровню через 24 часа. На 5-е сутки наблюдалось повторное увеличение концентрации Cs, которая сохранялась на повышенном уровне в течение последующих 2-х суток. Исследование изменения активности Н-СМазы в коре головного мозга крыс на разных сроках после введения животным Poly I:C выявило угнетение активности фермента на 3-и сутки после введения животным Poly I:C и вновь повышение ее до базального уровня на 5-е сутки. Цитотоксическая активность NK-клеток селезенки крыс также была угнетена у животных экспериментальных групп на 3-и сутки после введения препарата Poly I:C при соотношениях эффектор:мишень 12:1 и 25:1.

Таким образом, результаты исследования позволяют предположить, что изменение интенсивности трансдукции сигнала IL-1β в клетках коры головного мозга крыс, цитотоксической активности NK-клеток селезенки, а также баланса эндогенных глюкокортикоидных гормонов у животных вовлекаются в реализацию нейроэндокринно-иммунных взаимодействий при развитии синдрома хронической усталости в эксперименте.

Поддержано грантом РФФИ № 03-04-49236.

ИЗУЧЕНИЕ ЭПИТОПОВ ТИРЕОГЛОБУЛИНА, К КОТОРЫМ НАПРАВЛЕНЫ ЕСТЕСТВЕННЫЕ АУТОАНТИТЕЛА МЫШЕЙ ЛИНИИ SJL/J

Шашкова О.А., Руденко И.Я., Пиневич А.А., Климович В.Б.

ФГУ Центральный научно-исследовательский рентгенорадиологический институт РОСЗДРАВА, Санкт-Петербург, Россия

В сыворотке крови здоровых людей и животных в отсутствии иммунизации выявляют антитела, направленные к собственным антигенам организма. Их называют естественными аутоантителами (еААТ). Аутореактивный репертуар еААТ возникает на ранних этапах онтогенеза и остается стабильным в течение жизни индивидуума. Одним из аутоантигенов, с которым взаимодействуют еААТ, является тиреоглобулин (Тг) – белок-предшественник тиреоидных гормонов. До сих пор не существует четкой характеристики еААТ, но известно, что их эпитопная специфичность отличается от наблюдаемой у ААТ, выявляемых при аутоиммунных заболеваниях. Цель данной работы заключалась в изучении природы эпитопов, к которым направлены еААТ к Тг (еАТг).

Собирали образцы сывороток крови у интактных мышей SJL/j (n=19), начиная с возраста 2 месяца, 1 раз в 10 дней в течение 5 месяцев. В дальнейшем сыворотки объединяли и глобулиновую фракцию, содержащую еАТг, осаждали сульфатом аммония. Эпитопную специфичность еАТг определяли методом конкурентного иммуноферментного анализа (ИФА) с помощью моноклональных антител (МКАТ) против Тг мыши. Видовую специфичность еАТг, выявляли в ИФА и иммуногистохимическом анализе. Исследование проводили на Тг человека, быка, свиньи, крысы и препаратах щитовидных желез курицы, голубя, кролика, кошки, собаки, используя МКАТ. Для изучения конформации эпитопов Тг мыши в ИФА проверяли взаимодействие МКАТ с экстрактом щитовидной железы мыши, подвергшимся обработке дитиотреитолом

и последующему алкилированию восстановленных SH-групп с помощью йодацетамида. Способность МКАТ, направленных к тем же эпитопам, что и еАТг, перекрестно взаимодействовать с тиреоидными гормонами, тиреоидной пероксидазой и ацетилхолинэстеразой исследовали в ИФА.

Среди полученных в лаборатории МКАТ были отобраны 8, направленных к тем же эпитопам, что и еАТг мышей линии SJL/j. Установлено, что ни одно из МКАТ не является видоспецифичным для Тг мыши. Все МКАТ взаимодействуют с Тг разных видов млекопитающих, 4 МКАТ дополнительно распознают Тг птиц. Следует отметить, что одно МКАТ направлено к эпитопу, представленному на Тг всех исследованных видов. 4 МКАТ взаимодействуют с обработанным дитиотриэтолом Тг так же, как и с нативным, то есть они направлены к линейным эпитопам. Для других 4 МКАТ реакция с денатурированным антигеном достоверно слабее, что, вероятно, свидетельствует о направленности к конформационным эпитопам. В результате исследования взаимодействия МКАТ с другими антигенами установлено, что одно МКАТ перекрестно взаимодействуют с тиреоидной пероксидазой и ацетилхолинэстеразой. Ни одно из МКАТ не направлено к гормоногенным участкам Тг.

Таким образом, нами выявлено и охарактеризовано 8 МКАТ, направленных к тем же эпитопам Тг, что и еАТг мышей линии SJL/j. На примере данных МКАТ установлено, что еАТг мыши могут быть направлены к конформационным и линейным эпитопам Тг, представленным на эволюционно консервативных участках молекулы. еААТ мыши могут распознавать общие антигенные детерминанты Тг, тиреоидной пероксидазы и ацетилхолинэстеразы.

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

ОЦЕНКА ВОСПАЛЕНИЯ ПРИ КСЕНОГЕННОЙ, АУТОЛОГИЧНОЙ И АЛЛОГЕННОЙ ТРАНСПЛАНТАЦИИ КЛЕТОК

Швецова Е.В., Ткаченко С.Б., Иванов А.А., Васильев А.В., Терских В.В.

Институт биологии развития им Н.К. Кольцова РАН, Россия;

Институт молекулярной медицины ММА им. И.М. Сеченова, Москва, Россия

Введение. Одной из актуальных проблем современной биомедицины является обеспечение биологической безопасности при проведении трансплантаций тканей и клеток. Выбор клеточного материала, использование аутологичных и аллогенных клеток, реализация технологии культивирования и трансплантации определяет эффективность и безопасность метода.

Цель и задачи. В данной работе проведена сравнительная оценка реакции организма в ответ на введение ксеногенных, аутологичных и аллогенных трансплантатов фибробластов кожи в модели восстановления структуры дермы.

Материалы и методы. Работа проводилась на кроликах породы Шиншила, вес 1800 г.

Для получения фибробластов у кроликов забирались биоптаты кожи со спины, из которых по стандартной методике получали фибробласты. Биоптаты механически измельчались, ферментативно обрабатывались с использованием коллагеназы I типа. Полученную первичную культуру высаживали на культуральный пластик в питательной среде DMEM с добавлением 10% сыворотки крупного рогатого скота в условиях CO^2 инкубатора при температуре 37°С.

Для получения дермальных фибробластов человека использовались биоптаты кожи после пластических операций, полученных с разрешения пациента. Клеточная культура фибробластов была получена способом, описанным выше. При достижении конфлюэнтного слоя, ксеногенные, аллогенные и аутологичные фибробласты пассировались и в дальнейшем культивировались на биодеградируемых коллагеновых пористых микроносителях (микросферах размером 200 мкм), что позволяло сохранять их жизнеспособность и эффективность в процессе транспортировки и трансплантации, а также обеспечивало пролонгированное воздействие клеток после инъекций трансплантата в дерму.

Экспериментальным животным в область верхней губы внутрикожно инъецировались ксеногенные (дермальные фибробласты человека) аутологичные и аллогенные дермальные фибробласты кролика на микроносителях. На 3, 7, 14, 21, 28 сутки после трансплантации у кроликов бралась биопсия в месте инъецирования. Биоптаты замораживались, после чего получали криосрезы, часть из которых окрашивалась стандартными красителями - гематоксилином и эозином. Вторая часть использовалась для иммуногистохимического исследования.

Основные результаты. Ксеногенные клетки сохранялись после трансплантации в дерму в течение 7 суток, аллогенные фибробласты до 28 суток, аутологичные фибробласты до конца времени наблюдения.

Во всех экспериментальных вариантах отсутствовала выраженная воспалительная реакция. При аллогенных и аутологичных трансплантациях в дерме на границе с трансплантатом не наблюдалась выраженная моноцитарно-макрофагальная реакция. Инъецированные фибробласты усиливали экспрессию гладкомышечного актина, что свидетельствует о приобретении ими свойств миофибробластов с выраженной контрактильной активностью. Экспрессия изученных иммуногистохимических маркеров свидетельствует о нормальном соотношении клеток и внутриклеточного матрикса.

Заключение. Экспериментальные исследования показали возможность успешной трансплантации как аутологичных, так и аллогенных культивируемых фибробластов. Трансплантация не вызывает выраженной реакции воспаления, при этом клетки эффективно воздействуют на структуру и функциональные показатели дермы кожи.

ТОНКАЯ СПЕЦИФИЧНОСТЬ И ИЗМЕНЕНИЕ АФФИННОСТИ АНТИТЕЛ В ПРОЦЕССЕ ФОРМИРОВАНИЯ ГУМОРАЛЬНОГО ОТВЕТА НА НАНОГРАММОВЫЕ ДОЗЫ БЕЛКА ASP F 2

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

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

Гуморальный ответ на белковый антиген характеризуется формированием иммуноглобулинов, способных связывать В-клеточные эпитопы белка с возрастающей аффинностью. Тонкая специфичность и созревание аффинности антител, формирующихся в ответ на иммунизацию высокой дозой белка в адъюванте, хорошо изучены. Одна-

ко, гуморальный ответ на аллерген, регулярно поступающий в организм в низких дозах без адъюванта, не достаточно охарактеризован.

Целью данной работы было определить тонкую специфичность и изменение аффинности антител, формирующихся в ответ на иммунизацию мышей нанограммами белка-аллергена Asp f 2 из экстракта гриба *Aspergillus fumigatus*.

Мыши линий BALB/c, C57BL/6 и CBA были проиммунизированы подкожно либо однократно 50 мкг Asp f 2 в адъюванте, либо многократно (10 раз в течение 2-х недель) 50 нг/мышь/инъекцию в фосфатном буфере. Продукцию антител определяли с помощью иммуноферментного анализа, аффинность антител методом конкурентного ингибирования. Тонкую специфичность иммунного ответа выявляли с использованием синтетических пептидов, перекрывающих 68% последовательности Asp f 2.

В результате иммунизации мышей всех трех линий высокой дозой белка в адъюванте наблюдалась длительная продукция IgG, максимум которой наблюдался на 5-ю неделю после иммунизации. Высокая аффинность антител наблюдалась начиная с первой недели после иммунизации и сохранялась постоянной ($Kd=10^{-7}M$). При данной схеме иммунизации, в качестве доминантных распознавались два эпитопа в составе Asp f 2, в то время как в случае многократной иммунизации низкими дозами наблюдалась расфокусировка иммунного ответа. Продукция IgE антител наблюдалась лишь в ответ на низкие дозы Asp f 2, при этом максимум продукции IgG наблюдали на вторую неделю после первой инъекции, IgE на третью. Аффинность антител возрастала постепенно, достигая уровня аффинности антител, индуцированных иммунизацией высокой дозой Asp f 2 в адъюванте, на вторую неделю. Наблюдаемые изменения аффинности IgE совпадали с изменениями аффинности, наблюдаемыми в случае IgG.

Таким образом, иммунная система способна распознавать нанограммовые дозы белкового антигена, отвечая продукцией как IgG, так и IgE. Аффинность как IgG, так и IgE возрастает постепенно, достигая величины сопоставимой с аффинностью IgG в ответ на иммунизацию высокой дозой белка в адъюванте. Многократная иммунизация низкими дозами белка без адъюванта приводит к расфокусировке тонкой специфичности иммунного ответа.

ДИФФЕРЕНЦИРОВКА ЭФФЕКТОРНЫХ ЛИМФОЦИТОВ $CD4^+$ $CD27^{hi}$ И ЕЕ РОЛЬ В ФОРМИРОВАНИИ ПРОТЕКТИВНОГО ОТВЕТА ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ТУБЕРКУЛЕЗНОЙ ИНФЕКЦИИ

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

Государственное учреждение центральный научно-исследовательский институт туберкулеза РАМН, Москва, Россия

К настоящему времени установлено, что протекция при туберкулезной инфекции опосредована активностью Т-лимфоцитов и, в первую очередь, лимфоцитов $CD4^+$. В очаге инфекции лимфоциты CD4 продуцируют IFN-γ, стимулирующий противомикобактериальную активность инфицированных макрофагов. Таким образом, дифференцировка Т-лимфоцитов, генерация клеток, секретирующих IFN-γ, и их миграция в легкие являются ключевыми моментами, обусловливающими протекцию при туберкулезной инфекции. Недавно было показано, что эффекторные лимфоциты $CD4^+$, экспрессирующие фенотип $CD44^{hi}$ $CD62L^{lo}$, состоят из двух субпопуляций, отличающихся по уровню экспрессии молекул CD27 (рецептор семейства TNF). Высокой способностью к продукции IFN-γ обладают только лимфоциты $CD62L^{lo}CD27^{lo}$, что позволяет рассматривать эти клетки как «высокодифференцированные» эффекторы (ВДЭ), в отличие от менее дифференцированных эффекторов, экспрессирующих фенотип $CD62L^{lo}$ $CD27^{hi}$. Соотношение между данными субпопуляциями эффекторов и их роль в протекции остаются невыясненными.

Целью настоящей работы явилось исследование дифференцировки эффекторных лимфоцитов $CD4^+$ при экспериментальной туберкулезной инфекции.

Исследования проводили на мышах линии C57BL/6, инфицированных вирулентными *M. tuberculosis* штамма H37Rv. С помощью магнитного сортинга из суспензии клеток селезенки инфицированных мышей выделяли субпопуляции лимфоцитов $CD4^+CD27^{hi}$ и $CD4^+CD27^{lo}$, и культивировали их *in vitro* в присутствии антигена и антигенпрезентирующих клеток. В разные сроки после начала культивирования в каждой из культур оценивали уровень экспрессии молекул CD27, функциональную и пролиферативную активность клеток и апоптоз. Проведенный анализ показал, что в ранние сроки культивирования лимфоциты $CD4^+CD27^{lo}$ активно пролиферируют и продуцируют IFN-γ, после чего основная их часть уходит в апоптоз. В результате, уже через 10 дней культивирования содержание живых клеток в таких культурах не превышает 2%. Лимфоциты $CD4^+CD27^{hi}$ исходно характеризуются низкой пролиферативной активностью и низкой продукцией IFN-γ. Эти клетки, однако, менее подвержены апоптозу и к 10 дню количество живых клеток в культурах CD4 $CD27^{hi}$ составляет 14%. В процессе культивирования лимфоциты CD4 $CD27^{hi}$ перестают экспрессировать рецепторы CD27 и превращаются в высокодифференцированные эффекторы CD4 $CD27^{lo}$. Через 23 дня содержание лимфоцитов $CD27^{lo}$ в культурах CD4 $CD27^{hi}$ составляет более 50%. Полученные результаты свидетельствуют о том, что длительная антигенная стимуляция вызывает дифференцировку лимфоцитов CD4 $CD27^{hi}$ с образованием ВДЭ, имеющих фенотип CD4 $CD27^{lo}$.

Подтверждение происхождения ВДЭ $CD27^{lo}$ из предшественников $CD27^{hi}$ было получено *in vivo* в экспериментах по адоптивному переносу лимфоцитов CD4 $CD27^{hi}$. У мышей, которым вводили лимфоциты CD4 $CD27^{hi}$, перенесенные клетки *in vivo* снижали экспрессию молекул CD27. Через 20 часов после переноса около 20% клеток донора, выделенных из легких мышей-реципиентов, имели фенотип CD4 $CD27^{lo}$.

Значение эффективности дифференцировки лимфоцитов $CD27^{hi}$ в лимфоциты $CD27^{lo}$ для течения туберкулеза исследовали на мышах с разной резистентностью к данной инфекции. Опыты показали, что высокое содержание в легких ВДЭ коррелирует с более мягким течением инфекции.

Таким образом, эксперименты *in vivo* и *in vitro* показали, что предшественниками высокодифференцированных эффекторов $CD4^+CD27^{lo}$ является субпопуляция лимфоцитов $CD4^+CD27^{hi}$. Предполагается, что данный этап дифференцировки может происходить в легочной ткани. Образование ВДЭ CD4 $CD27^{lo}$ важно для протекции при туберкулезной инфекции.

РОЛЬ ЖЕНСКИХ ПОЛОВЫХ СТЕРОИДОВ В РЕАЛИЗАЦИИ ИММУНОМОДУЛИРУЮЩИХ ЭФФЕКТОВ ХОРИОНИЧЕСКОГО ГОНАДОТРОПИНА

Ширшев С.В., Куклина Е.М.

Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН, Пермь, Россия

В исследовании механизмов перестройки иммунной системы при беременности важную роль играет оценка иммуномодулирующей активности гормонов репродукции – в частности, хорионического гонадотропина (ХГ), основного пептидного гормона плаценты. Показано, что ХГ имеет специфические рецепторы на разных типах иммунокомпетентных клеток и оказывает существенное влияние как на адаптивные, так и на неспецифические защитные реакции организма. Однако при этом, как правило, не учитывается, что ХГ, в соответствии со своей основной функцией, стимулирует синтез гонадами половых стероидных гормонов, эстрадиола и прогестерона, и, все свои эффекты, в том числе и иммуномодулирующие, *in vivo* реализует на фоне этих гормонов.

Целью настоящей работы было исследование роли эстрадиола и прогестерона в реализации эффектов ХГ в отношении Т-лимфоцитов и нейтрофилов человека. Моделируя гормональный фон, характерный для разных периодов беременности, мы оценили комбинированное действие указанных гормонов и сопоставили его с индивидуальными гормональными эффектами.

Материалы и методы. Т-лимфоциты и нейтрофилы выделяли из периферической крови женщин. Концентрации гормонов соответствовали их уровням в крови в разные триместры беременности. В работе оценивали влияние гормонов на различные этапы созревания и функционирования Т-лимфоцитов – тимическую дифференцировку (фенотипированием, с помощью проточной цитометрии), пролиферацию (по включению ^{3}[H]-тимидина), апоптоз (проточной цитометрией, в тесте с иодидом пропидия), а также продукцию основных Th1- и Th2-цитокинов - IFNγ и IL-4 (иммуноферментным анализом). В популяции нейтрофилов определяли фагоцитарную активность (световой микроскопией, по поглощению различных объектов), продукцию активных кислородных метаболитов (по интенсивности люминолзависимой хемилюминесценции клеточной культуры) и апоптоз.

Основные результаты. На основании полученных данных можно выделить как минимум четыре типа взаимной гормональной регуляции. Первый тип - это ситуация, при которой индивидуальные эффекты ХГ не изменяются на фоне стероидных гормонов. Так регулируется дифференцировка тимоцитов в присутствии тимического эпителия (ХГ 100 МЕ/мл, стимуляция). К этому же типу регуляции можно отнести и влияние гормонов на ФГА-индуцированную пролиферацию Т-лимфоцитов (угнетение), продукцию IL-4 (стимуляция) и анти-CD95-зависимый апоптоз нейтрофилов (угнетение), при которой модулирующей активностью обладают все гормоны и их сочетания. Второй и наиболее часто встречаемый тип регуляции - нивелирование или полная отмена индивидуальных эффектов ХГ в присутствии стероидных гормонов. Он относится к действию ХГ на дифференцировку интактных тимоцитов (ХГ 100 МЕ/мл, стимуляция), на активационный апоптоз $CD8^{+}$-Т-лимфоцитов (ХГ 100 МЕ/мл, стимуляция), продукцию IFNγ (ХГ 100 МЕ/мл, угнетение), нейтрофильный фагоцитоз латексных частиц (ХГ 100 МЕ/мл, стимуляция), продукцию активных форм кислорода в ответ на стимуляцию зимозаном (ХГ 100 МЕ/мл, угнетение). Нивелирование эффектов ХГ в присутствии стероидов может реализовываться как минимум двумя механизмами – за счет регуляции стероидными гормонами плотности и аффинности рецепторов для ХГ на клеточной мембране или перекрывания гормональных сигналов на внутриклеточном уровне. Третий тип взаимной гормональной регуляции – наличие модулирующего действия комбинации ХГ и стероидных гормонов при отсутствии индивидуальных эффектов ХГ. Таким образом регулируется активационный апоптоз $CD4^{+}$-Т-лимфоцитов (угнетение), спонтанная окислительная активность нейтрофилов (стимуляция) и апоптоз этих клеток в условиях стимуляции липополисахаридом (угнетение). Наиболее вероятный механизм данной регуляции – пермиссивные и/или сенсибилизирующие эффекты стероидов в отношении ХГ. И наконец, четвертый тип регуляции, который выявлен только для спонтанного апоптоза нейтрофилов, - изменение стимулирующего эффекта ХГ (10 МЕ/мл) на ингибирующий в присутствии стероидов.

Заключение. При совместном действии на клетки иммунной системы ХГ и женские половые стероиды в зависимости от дозы, типа клеток и их активационного статуса могут проявлять взаимные антагонистические, пермиссивные или сенсибилизирующие эффекты – аналогично их действию на основные мишени, ткани гонад. Поэтому для объективной оценки гормональной регуляции иммунитета при беременности, а также при других физиологических или патологических состояниях, особое значение имеет моделирование гормонального фона, с учетом максимально возможного числа составляющих.

ИММУНОМОДУЛИРУЮЩАЯ АКТИВНОСТЬ УЛЬТРАНИЗКИХ ДОЗ АЛКИЛИРУЮЩИХ СОЕДИНЕНИЙ КАК РЕЗУЛЬТАТ ИЗБИРАТЕЛЬНОГО НАРУШЕНИЯ ВНУТРИКЛЕТОЧНЫХ СИГНАЛЬНЫХ КАСКАДОВ

Шмарина Г.В.[1], Пухальский А.Л.[1], Сабельников А.[2], Алешкин В.А.[3]

[1]Медико-генетический научный центр РАМН, Москва, РФ;

[2]Восточно-Каролинский университет, Гринвилл, Северная Каролина, США;

[3]Московский НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского, Москва, РФ

Алкилирующие препараты (АП), обязанные своим происхождением боевому отравляющему веществу сернистому иприту, широко применявшемуся в годы I Мировой войны, оказывают в обычных терапевтических дозах выраженный цитостатический эффект. Этот эффект связан с необратимым повреждением ДНК вследствие образования внутри- и межмолекулярных сшивок. Однако при постепенном снижении дозы количество сайтов, доступных для алкилирования, также уменьшается, и препарат начинает оказывать действие лишь на некоторые клетки. Ранее нами было показано, что такая избирательность действия связана с тем, что в ультранизких дозах (примерно в 100 раз ниже обычной терапевтической) АП способны блокировать передачу сигнала через рецептор для IL-2. Можно предполагать, что сигнальные каскады других поверхностных рецепторов, в частности, Fas рецептора и рецептора для TNF-α, также чувствительны к воздействию низких доз алкилирующих агентов.

Цель работы. Исследовать влияние ультранизких доз АП мелфалан на элементы сигнальных каскадов, включающихся после взаимодействия рецептора для TNF (TNFR) с соответствующим лигандом (TNF-α).

Методика исследования. Клетки фибробластоидной линии L929 обрабатывали различными концентрациями рекомбинантного TNF-α. В течение 1 ч, предшествовавшего добавлению TNF-α, клетки инкубировали в присутствии ультранизких концентраций (0,1; 0,3; 1 мкг/мл) мелфалана. С целью подавления белковых синтезов клетки обрабатывали актиномицином D (10 мкг/мл).

Результаты. При обработке клеток линии L929 рекомбинантным TNF-α наблюдается цитопатический эффект, имеющий дозозависимый характер. Преинкубация клеток в присутствии мелфалана оказывала выраженное защитное действие (все дозы мелфалана были одинаково эффективны). Известно, что алкилирующие агенты в низких концентрациях являются мощными индукторами клеточного антистрессового ответа, который представляет собой специальную программу экспрессии генов. Антистрессовый сигнальный каскад включает активацию стрессорных киназ JNK/SAPK и индукцию транскрипции генов c-fos и c-jun, продукты которых являются важными компонентами клеточной защиты от разного рода цитотоксических агентов. Учитывая эти данные, нельзя исключить, что протективный эффект мелфалана обусловлен активацией внутриклеточных механизмов защиты от стресса. Однако защитное действие мелфалана сохранялось и в условиях остановки белковых синтезов в результате обработки клеточных культур актиномицином D. Более того, часовая обработка мелфаланом (0,3 мкг/мл) существенно снижала активность транскрипционного фактора NF-κB (p60) в ядерных экстрактах клеток, преинкубированных с актиномицином D и стимулированных рекомбинантным TNF-α. Полученные данные свидетельствуют о том, что мелфалан способен блокировать мембранные и/или цитоплазматические компоненты сигнального каскада TNFR.

Выводы. Иммуномодулирующий эффект ультранизких концентраций АП связан с нарушением проведения сигналов от поверхностных рецепторов клетки. Наиболее уязвимыми мишенями для АП в ультранизких концентрациях, по-видимому, являются активированные клетки, экспрессирующие поверхностные рецепторы, сопряженные с апоптотическими сигнальными каскадами, и/или рецепторы для факторов роста и выживания.