

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

ВЛИЯНИЕ ЦИТОКИНОВ НА АДГЕЗИОННУЮ И МИГРАЦИОННУЮ АКТИВНОСТЬ ЭНДОТЕЛИАЛЬНЫХ КЛЕТОК

Амчиславский Е.И., Фрейдлин И.С.

*ГУ НИИ экспериментальной медицины РАМН,
Санкт-Петербург, Россия*

Для изучения адгезионной активности эндотелиальных клеток линии EA.hy 927 нами была разработана модельная система культивирования этих клеток на поверхности пластика, покрытого коллагеном I типа, который был нами приготовлен из сухожильных тяжей хвостов лабораторных крыс. Адгезия клеток линии EA.hy 927 на поверхности, покрытой коллагеном I типа, была в 2 раза выше, чем на поверхности пластика. С использованием этой модельной системы было изучено влияние провоспалительных цитокинов и ростового фактора bfgf на адгезионную активность клеток линии EA.hy 927. Цитокины TNF α и IL-1 β достоверно усиливали адгезию клеток линии EA.hy 927 во всех использованных концентрациях. Наиболее выраженные их стимулирующие эффекты были сопоставимы со стимулирующим действием в случае добавления к культуральной среде 10% эмбриональной телячьей сыворотки (ЭТС) (положительный контроль). Стимулирующее действие на адгезию эндотелиальных клеток хемокина IL-8 было выявлено лишь при использовании более высоких его концентраций. Ангиогенный ростовой фактор bfgf оказывал достоверное стимулирующее действие на адгезию клеток EA.hy 927 только в самой высокой из использованных концентраций. Нами была предпринята попытка уточнить механизм стимулирующего действия провоспалительных цитокинов на адгезию эндотелиальных клеток. С использованием проточной цитофлуориметрии оценивали экспрессию на поверхности эндотелиальных клеток линии EA.hy 927 молекул интегрина «альфаVбета3», которые участвуют в процессе адгезии эндотелиальных клеток к матриксу. Экспрессия данного интегрина на клетках линии EA.hy 927 была продемонстрирована, однако не удалось выявить зависимости уровня экспрессии этого интегрина от влияния провоспалительных цитокинов и ростового фактора bfgf. Оценку миграции клеток линии EA.hy926 проводили с использованием модифицированной системы Бойдена. Использовали поликарбонатные фильтры 24-х луночного формата (Becton Dickinson, США) с диаметром пор 3 мкм, предварительно обработанные раствором коллагена I типа (100 мкг/мл), полученного из крысиных сухожилий. Из всех использованных цитокинов только IL-1 β в высокой концентрации 1000 Ед./мл достоверно стимулировал спонтанную миграцию эндотелиальных клеток линии EA.hy 927. Таким образом, показана зависимость адгезионной и миграционной активности эндотелиальных клеток перевиваемой линии EA.hy 926 от влияния провоспалительных цитокинов. Ци-

токиновая регуляция адгезионной и миграционной активности эндотелиальных клеток имеет значение на всех этапах процесса ангиогенеза.

Работа поддержана грантами: РФФИ 03-04-48118, ИШ-540.2003.4

РАЗЛИЧИЯ ЭКСПРЕССИИ БТШ70 КЛЕТКАМИ РАЗНЫХ ЛИМФОИДНЫХ ОРГАНОВ МЫШЕЙ

Апполонова М.В., Сапожников А.М.

*Институт Биоорганической Химии РАН
им. Овчинникова и Шемякина, Москва, Россия*

В настоящее время хорошо известно, что интенсивность синтеза клетками белков теплового шока (БТШ), в частности, основного представителя данного семейства протеинов – БТШ70, является показателем «стрессированности» клеток. Это позволяет рассматривать уровень внутриклеточного содержания БТШ70 как важную характеристику реакции органов и тканей организма на повреждающие воздействия. Особый интерес представляет потенциальная диагностическая значимость данной мало исследованной характеристики клеток. С этих позиций, весьма актуальным является анализ уровня экспрессии БТШ70 в клетках иммунной системы как одного из показателей степени «активированности» организма. С целью проверки возможности такого подхода к оценке стрессовых нарушений иммунной системы и состояния всего организма мы исследовали различия уровня экспрессии БТШ70 в разных лимфоидных органах однородных групп инбредных линий мышей.

Исследования проводили на мышах линии BALB/c, CBA, C57BL/6, внутриклеточное содержание БТШ70 и ряд других характеристик тимоцитов, спленоцитов, клеток лимфатических узлов и костного мозга измеряли с помощью метода проточной цитофлуориметрии.

Цитометрический анализ уровня экспрессии БТШ70 в популяциях тимоцитов, спленоцитов, клеток лимфатических узлов и костного мозга показал, что содержание данных протеинов в исследуемых клетках сильно варьирует. У разных особей одного возраста и одной линии величина этого показателя для клеток одинаковой органной локализации может отличаться весьма существенно (более, чем на 100%). Такие сильные индивидуальные различия свидетельствуют о значимости данного показателя для характеристики статуса каждой отдельной особи, однако эти вариации не позволяют выявить достоверные межлинейные различия уровня экспрессии БТШ70 лимфоидными клетками. Наши суммарные данные свидетельствуют о снижении средней величины данного показателя для всех лимфоидных органов в ряду BALB/c, CBA, C57BL/6. Однако у животных всех линий выявля-

ются достоверные различия данного показателя между клетками разных лимфоидных органов. Наибольшее содержание БТШ70 наблюдается в клетках костного мозга и лимфатических узлов. При этом, несмотря на отсутствие достоверных отличий по данному признаку, средний уровень экспрессии БТШ70 костномозговыми клетками превышал в наших опытах таковой для клеток лимфоузлов. В лимфоцитах селезенки БТШ70 обнаруживалось значительно (в 1,5-2 раза) меньше. Далее, со сниженной еще примерно в 1,5 раза концентрацией внутриклеточных БТШ70 следуют тимоциты. Полученные данные свидетельствуют об отсутствии заметных различий между Т- и В-клетками по содержанию внутриклеточных БТШ70. На это указывает однородность окрашивания лимфоцитов ЛУ и селезенки, содержащих сопоставимые количества Т- и В-клеток, антителами к БТШ70.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант 03-04-49052).

КОНФОРМАЦИОННЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ γ -ГЛОБУЛИНА ПРИ ВЗАИМОДЕЙСТВИИ С КАТИОНАМИ ЦИНКА

Воробьева У.А., Денисова Е.А., Бабаева Е.Е., Чекиев С.Б.

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

Введение. Хорошо известно, что входящие в состав металлоферментов и металлопротеинов катионы не только являются ключевыми элементами активных центров, но и вовлекаются в структурные сайты связывания, стабилизирующие молекулы в их нативной конформации. К таким катионам относятся, в том числе, ионы цинка, играющие важную роль в обеспечении специализированных клеточных функций и непосредственно участвующие в реализации основных иммунных взаимодействий.

Целью исследования являлось изучение конформационных изменений и оценка концентрационных зависимостей при взаимодействии человеческого сывороточного γ -глобулина, способного, как показано нами ранее, присоединять и в определенных условиях донорствовать катионы меди находящимся в микроокружении макромолекулам, с ионами цинка, использованного в виде хлорида и сульфата.

Методика исследования предполагала освобождение приготовленного на 0,15 М растворе NaCl (рН 7.14-7.2) препарата γ -глобулина (Serva) от крупных ассоциатов белка мембранной фильтрацией (Millipore), инкубирование образцов (50-200 мкг/мл белка) с хлоридом или водным сульфатом цинка, примененными в концентрациях металла от 0,1 до 12,0 мкг/мл, в течение 1 час при 37°C с последующей спектрофотометрией в диапазоне длин волн от 190 до 320 нм и получением дифференциальных и разностных ультрафиолетовых спектров с использованием сканирующего спектрофотометра PU 8730 UV/VIS (Philips).

В результате проведенных исследований установлено, что надфизиологические концентрации цинка вызывают прирост концентрации раствора белка, обнаруживающий эффект насыщения γ -глобулина металлом. В дозах, меньших физиологических, взаимодействие цинка γ -глобулином вызывает гипохромию в спектре поглощения белка. Полученные данные указывают на определяемую содержанием цинка в растворе возможность разворачивания боковых (при взаимодействии металла с ними) и даже внутренних аминокислотных остатков шарнирной обла-

сти γ -глобулина во внемолекулярное пространство либо – компактизации глобулы (за счет встраивания катионов в сайты междоменного пространства).

Заключение. Результаты работы обосновывают представления о наличии у молекулы γ -глобулина как внешних, так и внутренних сайтов связывания катионов цинка и зависимости конформации белка в физиологических условиях, а следовательно и возможности реализации эффекторных функций молекулы, от того, какие конкретно сайты вовлекаются во взаимодействие с цинком при определенном молярном отношении белка и металла в растворе. Сопоставление с полученными нами ранее данными о взаимодействии γ -глобулина с катионами меди позволяет установить общие закономерности и особенности конформационных изменений белка при появлении в его микроокружении тех или иных катионов металлов.

РОЛЬ МОНОЦИТОВ В ОПИАТЭРГИЧЕСКОЙ РЕГУЛЯЦИИ ПРОЦЕССОВ ПРОЛИФЕРАЦИИ ЛИМФОЦИТОВ И ЦИТОКИНОВОГО СИНТЕЗА

Гейн С.В.^{1,2}, Баева Т.А., Черешнев В.А.¹

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

²Пермский государственный университет, Пермь, Россия

Цель работы – изучение роли моноцитов в реализации регуляторного влияния β -эндорфина и селективных лигандов δ - и μ -опиатных рецепторов на пролиферативный ответ лимфоцитов и продукцию IL-4 и IFN γ . Лейкоциты периферической крови здоровых мужчин-добровольцев в возрасте от 20 до 37 лет культивировали с ФГА 2,5 мкг/мл в 96-луночных планшетах в течение 72 часов. За 18 часов до окончания культивирования в лунки вносили по 2 мкКи ³H-метилтимидина. β -эндорфин 10⁻⁷, DAGO 10⁻⁸, DADLE 10⁻⁷ М и налоксона гидрохлорид 10⁻⁸М вносили в культуры сразу с момента их постановки. Определение концентрации IL-4 и IFN γ производили в супернатантах клеточных культур после 48 ч культивирования. Удаление моноцитов из фракции мононуклеаров производили методом адгезии на чашках.

Установлено, что β -эндорфин и синтетические агонисты δ - и μ -опиатных рецепторов с разной степенью интенсивности оказывали стимулирующий эффект на выраженность реакции бласттрансформации лимфоцитов в культурах с ФГА. На фоне блокады опиатных рецепторов эффекты β -эндорфина не отменялись, а напротив усиливались, что связано с самостоятельным стимулирующим эффектом налоксона. В культурах мононуклеаров, очищенных от моноцитов вышеперечисленные пептиды, как и налоксона гидрохлорид, оказывали угнетающий эффект на пролиферацию, наиболее выраженную в случае совместного внесения β -эндорфина и антагониста опиатных рецепторов.

β -эндорфин и налоксон в культуре лейкоцитов значительно активировали ФГА-индуцированный синтез IL-4, не влияя на уровень IFN γ . В случае удаления моноцитов из фракции мононуклеаров β -эндорфин и налоксон на уровень IL-4 и IFN γ не влияли.

Таким образом, β -эндорфин, налоксон и селективные агонисты δ - и μ -опиатных рецепторов стимулировали пролиферативный ответ лимфоцитов в присутствии митогена, сдвигая баланс Т-хелперов в сторону Th2 клеток. Этот эффект опиоидов зависел от присутствия моноцитов в клеточной культуре.

ВЫЖИВАНИЕ КЛЕТОК ЛИНИИ CTLL-2 И СОСТОЯНИЕ ИХ ЭНЕРГЕТИЧЕСКОГО МЕТАБОЛИЗМА В УСЛОВИЯХ ОКИСЛИТЕЛЬНОГО СТРЕССА И ДЕФИЦИТА АУТОКРИННЫХ ФАКТОРОВ

Гречихина М.В., Луценко Г.В.

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

Введение. В последнее время появляется все больше данных, указывающих на то, что выживание клеток млекопитающих находится под контролем факторов роста и аутокринных факторов (АФ) выживания. Ранее нами была описана экспериментальная модель, в которой создавался искусственный дефицит АФ в культуре клеток IL-2-зависимой линии CTLL-2, который приводил к временному нарушению энергетического метаболизма клеток и значительному снижению уровня внутриклеточного АТФ (Биол. Мембраны, 2003, Т.20, С.401–408). Основой для этой модели послужило явление, называемое клеточной десенсилизацией и заключающееся в том, что при длительном воздействии какого-либо фактора на клетки их первоначальная чувствительность к этому фактору постепенно снижается. Для создания дефицита АФ в культуре клетки CTLL-2 сначала культивировали в культурах высокой плотности, а затем в свежей среде переносили в культуры низкой плотности и в них проводили последующее культивирование.

Целью работы было исследование влияния дефицита АФ на выживание, уровень внутриклеточного АТФ и величину митохондриального трансмембранного потенциала (МТП) клеток линии CTLL-2 в условиях окислительного стресса.

Материалы и методы. Опытные клетки сначала культивировали в плотном осадке (1×10^6) в течение 14–16 часов, а затем переносили в свежей среде в культуру низкой плотности (1×10^5 клеток/мл) и в ней проводили последующее культивирование. Выживание клеток оценивали с использованием МТТ-теста. Уровень АТФ в клетках измеряли с использованием биолюминесцентного люциферин-люциферазного метода. Величину МТП клеток оценивали с использованием цитофлуориметра, окрашивая клетки родамином 123.

Основные результаты. Показано, что дефицит АФ весьма значительно влияет на выживание клеток при окислительном стрессе. При культивировании в условиях дефицита АФ клетки оказывались более чувствительными к окислительному стрессу, чем клетки, не испытывающие недостатка в АФ (контроль), и погибали при меньших концентрациях пероксида водорода, чем последние. Так, при концентрации H_2O_2 50 мкм выживание контрольных клеток составляло 84,7%, в то время как выживание опытных клеток – лишь 14,7%. Блеббинг (появление пузырей на поверхности клеток), который рассматривается в качестве одной из самых ранних реакций клеток на стрессовые воздействия, в условиях дефицита АФ также наблюдался при более низких концентрациях пероксида водорода, чем в контроле. При концентрации H_2O_2 50 мкм среди опытных клеток наблюдалось 79,9% клеток с блеббингом, а среди контрольных клеток – только 10,5%. Показано, что при окислительном стрессе в условиях дефицита АФ в культуре уровень АТФ в клетках снижается значительно быстрее, чем в отсутствие дефицита АФ. Так, при концентрации H_2O_2 25 мкм уровень внутриклеточного АТФ в контрольных клетках к 4-му

часу снижался на 58%, в то время как в опытных клетках – на 96%. При исследовании влияния окислительного стресса на величину МТП клеток CTLL-2 в условиях дефицита АФ было установлено, что в этом случае кроме клеток с высоким МТП (1000–1200 отн. Ед.) уже через 1 час появляются клетки с очень низким МТП (60–80 отн. Ед.). Со временем доля последних постепенно растет, достигая 40–50% к 3-му часу культивирования. В то же время, если окислительному стрессу подвергали клетки, не испытывающие недостатка в АФ, то наблюдался только один тип клеток, МТП которых снижался постепенно с 1100–1200 до 450–550 отн. Ед. к 3-му часу.

Заключение. Полученные результаты показывают, что окислительный стресс клеток CTLL-2 в условиях дефицита АФ, вызывая очень значительное снижение уровня внутриклеточного АТФ, приводит к отягощению состояния клеток, что проявляется в усилении блеббинга клеточной поверхности, появлении клеток с очень низким потенциалом митохондрий и в конечном итоге – в ускорении их гибели.

СРАВНИТЕЛЬНАЯ ОЦЕНКА ВЛИЯНИЯ НЕСЕЛЕКТИВНОГО И СЕЛЕКТИВНОГО ИНГИБИТОРОВ ЦИКЛООКСИГЕНАЗЫ НА ПРОЛИФЕРАТИВНЫЙ ОТВЕТ ЛИМФОЦИТОВ

Денисов В.Е.¹, Шилов Ю.И.^{1,2}, Солодников С.Ю.^{2,3}

¹Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН;

²Пермский государственный университет,

³Пермская государственная фармацевтическая академия МЗ РФ, Пермь, Россия

Как известно, нестероидные противовоспалительные средства (НПВС) обладают выраженной иммуномодулирующей активностью в основном за счет ингибирования циклооксигеназы (ЦОГ). Направленность иммунорегуляторного действия продуктов циклооксигеназного пути не однозначна. В частности, простагландин (ПГ) E_2 повышает уровень цАМФ и супрессирует иммунный ответ, а $PGF_{2\alpha}$ способен стимулировать антителообразование [Ширшев и др., 1994]. Показано, что неселективный ингибитор ЦОГ-1 и ЦОГ-2 диклофенак натрия в системе *in vivo* угнетал развитие гуморального и клеточноопосредованного иммунного ответа [Денисов и др., 2002]. Помимо ингибирования ЦОГ разные НПВС могут иметь и специфические эффекты, не связанные с основным механизмом действия, которые на уровне иммунной системы изучены недостаточно. Цель работы – сравнительная оценка влияния диклофенака натрия и мелоксикама (селективный ингибитор ЦОГ-2) на пролиферативный ответ лимфоцитов.

Материалы и методы. Пролиферативный ответ лимфоцитов периферической крови 10 практически здоровых мужчин-добровольцев (средний возраст 37 лет) оценивали по включению 3H -тимидина в 72-часовых культурах с фитогемагглютинином-П (ФГА, Sigma, США) в концентрациях 2,5; 5; 10; 20 и 40 мкг/мл. Диклофенак натрия вносили в культуры в среднеэффективной концентрации 15 мкг/мл ($4,7 \times 10^{-5}$ М), а также в диапазоне концентраций от 10^{-4} до 10^{-8} М; мелоксикам – 10^{-4} – 10^{-12} М.

Основные результаты. Установлено, что в концентрации 0,015 мг/мл диклофенак натрия активировал пролиферативный ответ в культурах с субоптимальными и

оптимальными концентрациями ФГА (табл.). Активирующий эффект выявлен и при концентрациях диклофенака 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} М (при добавлении 5 мкг/мл ФГА), а также при внесении 10^{-8} М препарата в культуры с 40 мкг/мл ФГА ($p < 0,05$; данные не приводятся). Мелоксикам оказывал наиболее выраженный эффект при концентрации 10^{-4} М, активируя пролиферацию в культурах с 5 мкг/мл ФГА и угнетая его при добавлении 20 мкг/мл ФГА (таблица). В концентрации 10^{-9} М мелоксикам ингибировал

пролиферативный ответ в культурах с 10 мкг/мл ФГА, а в дозе 10^{-10} М активировал его в культурах с добавлением 40 мкг/мл митогена ($p < 0,05$; данные не приводятся).

Заключение. Полученные результаты указывают на зависимость направленности эффекта НПВС от концентрации митогена, которая может определять различия экспрессии изоформ ЦОГ и синтез разных продуктов арахидоновой кислоты, что нуждается в дальнейшем изучении.

ТАБЛИЦА. ВЛИЯНИЕ ДИКЛОФЕНАКА НАТРИЯ, ИНДОМЕТАЦИНА И МЕЛОКСИКАМА НА ПРОЛИФЕРАТИВНЫЙ ОТВЕТ ЛИМФОЦИТОВ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ ЗДОРОВЫХ ЛЮДЕЙ В КУЛЬТУРАХ С ФГА

Препарат	Без митогена	ФГА, мкг/мл				
		2,5	5	10	20	40
Контроль	3,1126±0,0979 (1296)	3,9591±0,0892 (9100)	4,2784±0,0920 (18983)	4,4894±0,0661 (30859)	4,4683±0,0648 (30640)	4,3234±0,0676 (21059)
Диклофенак, 0,015 мг/мл	3,0753±0,0940 (1189)	4,0709±0,1144* (11774)	4,3316±0,0593* (21456)	4,6058±0,0741* (40343)	4,5302±0,0535 (33900)	4,4128±0,0826 (25868)
Мелоксикам 10^{-4} М	2,9447±0,1397 (881)	4,0369±0,0777 (10886)	4,4073±0,0728* (25547)	4,4571±0,0705 (28645)	4,3927±0,0750* (24702)	4,3004±0,0977 (19971)
Мелоксикам 10^{-5} М	2,9991±0,1469 (998)	4,0231±0,1042 (10547)	4,3946±0,0815* (24807)	4,5089±0,0690 (32278)	4,4747±0,0967 (29831)	4,3879±0,0849 (24428)

* – Приведены значения $M \pm t$ для $\log_{10}$ имп/мин (включение ^3H -тимидина), а в скобках – средние геометрические имп/мин (антилогарифм из $M \log_{10}$ имп/мин); * – $p < 0,05$ по отношению к контролю по парному t -критерию Стьюдента.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ FOXP3 – МОЛЕКУЛЯРНОГО МАРКЕРА РЕГУЛЯТОРНЫХ КЛЕТОК

Донецкова А.Д., Пичугина Л.В., Никонова М.Ф., Шарова Н.И., Ярилин А.А.

Государственный научный центр – Институт иммунологии МЗ, Москва, Россия

Ген FOXP3 является наиболее специфичным маркером естественных регуляторных CD4⁺CD25⁺ клеток. Этот ген располагается на X хромосоме в положении p11.23-q13.3 и кодирует синтез транскрипционного фактора, обладающего ДНК-связующим доменом winged helix или forkhead box (“FOX”), который играет ключевую роль в иммунной регуляции.

Цель работы: выявить экспрессию маркера FOXP3 на покое и активированных митогенами лимфоцитах периферической крови.

Материалы и методы: мононуклеары периферической крови (МНПК) выделяли из гепаринизированной крови здоровых доноров в градиенте плотности фикола-верографина. Клетки фракционировали путем последовательного пэннинга, культивировали в полной культуральной среде (ПКС) без или с добавлением стимуляторов: фитогемагглютинаина (10 мкг/мл), форболмиристатацетата (50 нг/мл) с иономицином (2 мкмоль/мл). По окончании срока инкубации (24-72 часа) выделяли РНК, проводили обратную транскрипцию, затем ПЦР с праймерами FOXP3 (5'-ccacttgacagacaccatttg-3' и 5'-catgatcagcctcacaccac-3'), электрофорез продуктов реакции амплификации в агарозном геле. Фенотипический анализ клеток проводили на проточном цитофлуориметре FACScalibur.

Результаты. Количество естественных регуляторных CD4⁺CD25⁺ клеток в периферической крови здоровых лиц составило от 0,8 до 4,4%. Добавление фитогемагглютинаина приводило к резкому увеличению данной популяции (до 65,6-78,6%), однако изменения экспрессии мРНК FOXP3 не происходило. Также не влияла на экспрессию FOXP3 активация форболмиристатацетатом с иономицином в течение 24 часов. После выделения Т-клеток путем отрицательной селекции количество CD4⁺CD25⁺ клеток увеличивалось до 7,4-8,6%. мРНК FOXP3 определяли в ПЦР при концентрации клеток 2×10^6 , 5×10^6 , 8×10^6 /мл. Экспрессия FOXP3 без фракционирования лимфоцитов и их стимуляции выявлялась только при концентрации клеток 8×10^6 /мл.

Заключение. Экспрессия молекулярного маркера естественных регуляторных клеток FOXP3 напрямую зависит от количества МНПК и не зависит от их стимуляции митогенами.

ВЛИЯНИЕ ХОРИОНИЧЕСКОГО ГОНАДОТРОПИНА НА ОКИСЛИТЕЛЬНУЮ И ФАГОЦИТАРНУЮ АКТИВНОСТЬ МОНОЦИТОВ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ ЖЕНЩИН

Заморина С.А., Ширшев С.В.

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

Введение. В период беременности моноциты/макрофаги кумулируются в децидуальной оболочке благодаря стероидному фону и принимают участие в имплантации и

плацентации за счет ремоделирования тканей эндометрия и инициации процессов неоваскуляризации. Кроме этого, моноциты/макрофаги осуществляет клиренсную функцию, фагоцитируя патогены, клеточный детрит и апоптотические тельца, находясь под постоянным контролем хорионического гонадотропина (ХГ).

Цель работы – изучение эффектов ХГ на окислительную и фагоцитарную активность моноцитов женщин.

Материалы и методы. Объектом исследования служили фракционированные мононуклеарные клетки периферической крови женщин, находящиеся в фолликулярной фазе менструального цикла, ввиду их большей чувствительности к действию гормона. Выделенные клетки преинкубировали с ХГ в физиологических дозах 10 и 100 МЕ/мл в течение часа при 37°C, после чего определяли продукцию активных форм кислорода в реакции люминол-зависимой хемилюминесценции (ЛЗХЛ) и уровень миелопероксидазы (МПО) в супернатантах спектрофотометрическим методом. Помимо этого оценивали фагоцитарную активность фракционированных моноцитов по отношению к латексным частицам, рассчитывая процент фагоцитирующих клеток и их поглотительную активность (фагоцитарный индекс).

Основные результаты. Установлено, что ХГ в дозе 100 МЕ/мл снижал уровень моноцитов, фагоцитирующих латексные частицы, не влияя на их поглотительную активность. Показано, что гормон (10 и 100 МЕ/мл) значительно угнетал продукцию МПО моноцитами.

ХГ в дозе 100 МЕ/мл оказывал депрессивный эффект на уровень спонтанной ЛЗХЛ. В то же время, по отношению к латекс-стимулированной ЛЗХЛ гормон (100 МЕ/мл) оказывал стимулирующее действие, которое было зафиксировано в динамике всего наблюдения (5, 10, 15, 20 мин). Таким образом, регуляция окислительной активности моноцитов гормоном определяется активационным статусом клеток.

Заключение. ХГ активно контролирует фагоцитарную и окислительную активность моноцитов женщин. Так, по отношению к интактным моноцитам гормон оказывал преимущественно депрессивное действие, угнетая как фагоцитарную, так и окислительную активность этих клеток. По-видимому, снижение окислительного потенциала в данном случае необходимо для предупреждения антизиготных реакций. Стимуляция продукции активных форм кислорода, оцениваемая в реакции латекс-индуцированной ЛЗХЛ в фолликулярную фазу менструального цикла оправдана с биологической точки зрения.

ОЦЕНКА ВЛИЯНИЯ БЕСТИМА НА АКТИВНОСТЬ ФАГОЦИТАРНЫХ КЛЕТОК МЫШЕЙ ЛИНИИ СВА С ГНОЙНОЙ СТАФИЛОКОККОВОЙ ИНФЕКЦИЕЙ

Зурочка В.А., Городечный П.П., Вяткин Е.Ю.

ГОУ ВПО Челябинская государственная медицинская академия; НИИ иммунологии ЧелГМА, Россия

Изучали действие нового иммуномодулятора Бестим на активность нейтрофилов и моноцитов перитонеального экссудата мышей линии СВА в норме и при развитии локальной гнойной стафилококковой инфекции.

Стафилококковую инфекцию вызывали путем введения *St. aureus* (Cowan 209) в дозе 10^8 мт/мл под апоневроз

задней лапы. В результате у мышей ко 2-3-м суткам развивалась флегмона задней лапы. Бестим вводился в дозе 0,1 мг/мл 5кратно через 24 часа после введения стафилококка. В контроле вводили под апоневроз физиологический раствор в том же объеме, что и стафилококк. Перитонеальные клетки получали через 24 часа после внутрибрюшинного введения 5% мясоептонного бульона. После последнего введения Бестима забирали клетки перитонеального экссудата и оценивали фагоцитарную, лизосомальную и НСТ-активность нейтрофилов и моноцитов.

Исследование показало, что в норме Бестим значительно стимулирует фагоцитарную активность нейтрофилов и макрофагов, усиливая их спонтанную и индуцированную НСТ-активность и вызывая рост числа лизосом в клетке. При развитии локальной стафилококковой инфекции Бестим по сравнению с группой мышей без лечения вызывал усиление фагоцитарной активности нейтрофилов и макрофагов перитонеального экссудата и восстанавливал до нормы НСТ-активность, не изменяя лизосомальную активность этих клеток.

Таким образом, Бестим в норме вызывает значительную активацию фагоцитарного звена иммунитета, при развитии гнойного воспаления стимулирует сниженные функции фагоцитов и восстанавливает до нормы метаболическую активность фагоцитов.

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

ИЗУЧЕНИЕ ФИЗИОЛОГИЧЕСКИХ ВЗАИМОСВЯЗЕЙ МЕЖДУ СИСТЕМАМИ ТЕРМОРЕГУЛЯЦИИ И ИММУНОГЕНЕЗА НА МЫШАХ

Калёнова Л.Ф., Фишер Т.А., Суховой Ю.Г.

НИИ общей и прикладной криологии ТНЦ СО РАН, Тюмень, Россия

Введение. В экспериментах на лабораторных животных установлено значительное влияние гипо- и гипертермии на активность неспецифических и специфических реакций иммунной системы (Козырева Т.В. с соавт., 2003; Brenner K.M. et.al., 1999). Также известно, что повышение температуры тела представляет собой важный и часто неотъемлемый компонент адекватного иммунного ответа на инфекционные антигены. Приведенные примеры свидетельствуют о том, что между системами терморегуляции и иммуногенеза существует взаимосвязь. В то же время отсутствуют работы по определению температурных режимов, способствующих селективной активации клеточного и/или гуморального звеньев иммунной системы.

Цель работы – определить влияние разных вариантов тепловых и холодовых воздействий на неспецифические и специфические реакции иммунной системы лабораторных животных.

Материалы и методы. Эксперимент выполнен на лабораторных мышах. Животные были разделены на группы: интактный контроль (К), воздействие тепла (Т), воздействие холода (Х), контрастная смена температуры с теплой на холодную (Т+Х), с холодной на теплую (Х+Т). В качестве температурного фактора использовались водные ванны. Температура теплой воды (Т) составляла +40-42°C, а холодной (Х) +7-9°C. Длительность пребывания животных в холодной воде составляла 5 сек, а в теплой 30 сек. Манипуляции с животными проводились один раз в день в течение 5-ти дней. Забой животных проводился методом цервикальной

дислокации в шейном отделе позвоночника. Оценивалась способность перитонеальных макрофагов к адгезии опсонизированных IgG эритроцитов барана, их поглощению, а также образованию свободных радикалов кислорода. Активность гуморального иммунитета оценивали методом определения числа антителообразующих клеток в селезенке в ответ на внутрибрюшинную иммунизацию эритроцитами барана (ЭБ) по Cunningham (1968), а клеточного иммунитета – по реакции гиперчувствительности замедленного типа на ЭБ по Crowle (1975). Иммунизацию животных ЭБ проводили после последней водной процедуры. Сравнительную оценку полученных результатов проводили методом вариационной статистики с применением критерия *t* Стьюдента в программе «SPSS 11,5 для Windows».

Основные результаты. Под влиянием кратковременного воздействия на организм животных температурного фактора наблюдаются изменения активности иммунной системы, особенно значимые в течение первых 3-х дней от начала температурного воздействия. Перитонеальные макрофаги на воздействие высокой (Т) и низкой (Х) температуры отвечают стереотипным повышением метаболической, адгезионной и поглотительной активности, в то время как реакции клеточного и гуморального иммунитета на введение гетерологичного антигена (ЭБ) изменяются в диаметрально противоположных направлениях. Под влиянием тепловых воздействий активируется преимущественно гуморальное звено, а под влиянием холодных – преимущественно клеточное звено иммунной системы. При контрастной смене температуры воды с холодной на теплую (Х+Т) наблюдается усиление действия холодной воды – повышается активность клеточного, но снижается активность гуморального иммунитета, а при контрастной смене температуры воды с теплой на холодную (Т+Х) наблюдается умеренное повышение активности и клеточного и гуморального иммунитета. При увеличении числа циклов контрастной смены температуры воды с холодной на теплую (Х+Т) наблюдается стабильное повышение метаболической активности макрофагов, но снижение активности и клеточного и гуморального иммунитета. При изменении режима водно-температурных процедур – 2 раза в неделю в течение 3-х недель – наблюдается пролонгирование повышенной активности гуморального иммунитета и сохранение данного структурного следа после прекращения температурных воздействий до 2-х недель.

Заключение. Иммунный ответ можно регулировать с помощью специально подобранных температурных режимов и длительности процедур. В связи с тем, что наиболее значимые изменения в реакциях иммунной системы происходят первые 3 дня от начала воздействия температурного фактора, достаточного для формирования первичного иммунного ответа на инфекционные антигены.

ГЕТЕРОГЕННОСТЬ КЛИНИКО-ЛАБОРАТОРНЫХ И ИММУНОЛОГИЧЕСКИХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ АНТИФОСФОЛИПИДНОГО СИНДРОМА У ДЕТЕЙ

Кикнадзе К.Г., Калинина Н.М., Воронцов И.М., Масалова В.В., Слизовский Н.В.

Санкт-Петербургская Государственная Педиатрическая медицинская Академия, Детская городская больница № 2 Святой Марии Магдалины, Санкт-Петербург, Россия

В последние годы клиницисты большое внимание уделяют изучению природы антифосфолипидного синдрома (АФС). АФС или Hughes-синдром это

аутоиммунные клиничко-лабораторные нарушения, включающие рецидивирующие тромбозы, постоянное невынашивание беременности, тромбоцитопению и циркуляцию в крови антифосфолипидных антител (АФА).

Серологическим маркером данного синдрома является гетерогенная популяция антител к фосфолипидам клеточных мембран: отрицательно заряженные (кардиолипид, фосфатидилсерин, фосфатидилинозитол и фосфатидные кислоты), реже нейтральные (фосфатидилэтаноламин). Для диагностики данного синдрома используют определение антител к кардиолипину и обнаружение волчаночного антикоагулянта. Более диагностически значимым является определение антител к фосфолипидсвязывающим сывороточным белкам (α_2 -гликопротеину-1, аннексину V, и протромбину).

Целью нашего обследования явилось рассмотреть прогностическую значимость, чувствительность и специфичность тестов, позволяющих составить оптимальный алгоритм диагностики АФС. На базе ДГБ № 2 СПб было обследовано 45 (n=45) детей с клиническими проявлениями АФС в возрасте от 5 до 17 лет. Из них 12 (26,7%) детей с СКВ, 3 (6,7%) – с миокардиодистрофией, 8 (17,7%) – с ишемическим поражением ЦНС, 10 (22,2%) – с артериальной гипертензией, 5 (11,1%) – с васкулитом. Остальные 7 (15,5%) – с различными ревматическими заболеваниями (ЮРА, ЮХА, ЮСА, дерматомиозит). В ходе обследования проводились следующие лабораторные исследования: клинический анализ крови, биохимический анализ крови, а также определения титра антител: к фосфолипидам клеточных мембран, к компонентам сосудистой стенки (коллагену, эндотелию, ДНК). Определялся титр антикардиолипидных антител и волчаночного антикоагулянта. Всем детям сделана развернутая коагулограмма, иммунограмма с определением антинуклеарного фактора, титра антистрептококковых антител, анализ мочи и копрограмма. Нужно отметить, что специфическими показателями для АФС являлись: высокий титр антифосфолипидных и антикардиолипидных антител. Наличие волчаночного антикоагулянта было характерным у больных СКВ. В клиническом анализе крови отмечалась анемия, тромбоцитопения ($130-150 \times 10^9/\text{л}$) у 15 детей. Низкий показатель времени свертываемости крови по Ли-Уайту выявлено у детей с дебютом СКВ или с обострением основного заболевания при вторичном АФС. В иммунограмме гипокомплементемия и положительный антинуклеарный фактор определялся при системных заболеваниях соединительной ткани на фоне вторичного АФС. Полученные результаты являются важными, но требуют продолжения исследования в этой области.

СПЕКТР КЛИНИЧЕСКИХ ПРОЯВЛЕНИЙ АНТИФОСФОЛИПИДНОГО СИНДРОМА У ДЕТЕЙ

Кикнадзе К.Г., Воронцов И.М., Калинина Н.М., Масалова В.В., Слизовский Н.В.

Санкт-Петербургская Государственная Педиатрическая Медицинская Академия; Детская городская больница № 2 Святой Марии Магдалины, Санкт-Петербург, Россия

В основе АФС лежит невоспалительная тромботическая васкулопатия, затрагивающая сосуды любого калибра и локализации, что определяет чрезвычайную широту спектра его клинических проявлений.

Выявление антифосфолипидного синдрома в педиатрии имеет важное прогностическое значение, поскольку предполагает высокий риск тромбозов, а также определяет течение и исход основного заболевания (системные заболевания соединительной ткани).

В кардиоревматологическом отделении ДГБ № 2 обследовались 45 детей в возрасте от 5 до 18 лет. Из них 12 (26,7%) детей с СКВ, 3 (6,7%) – с миокардиодистрофией, 8 (17,8%) – с ишемическим поражением ЦНС, 10 (22,2%) – с артериальной гипертензией, 5 (11,1%) – с васкулитом. Остальные с различными ревматическими заболеваниями (ЮРА, ЮХА, ЮСА, дерматомиозит). У детей с системными заболеваниями соединительной ткани антифосфолипидный синдром расценивался как вторичный. Ведущим клиническим проявлением поражения при АФС являлась сетчатость кожных покровов (77,7%; $p=35$). Поражение ЦНС проявлялось энцефалопатией, тенденцией преобладания артериальных тромбозов головного мозга. Мигрени и психические нарушения отмечались у детей с СКВ (26,7%; $p=12$). Мигреноподобные головные боли с тенденцией к артериальной гипертензии выявлены у детей с отягощенным наследственным анамнезом по тромбоцитическим заболеваниям. Варикозное расширение глубоких вен нижних конечностей отмечалось в основном у мальчиков (22,2%; $p=10$). Присутствовали нарушения со стороны гемостаза: гиперфибриногенемия, тромбоцитопения и повышение содержания антитромбина III, которые клинически проявлялись геморрагической сыпью и частыми носовыми кровотечениями (44,4%; $p=20$). Поражения со стороны сердечно-сосудистой системы характеризовались кардиомиопатией у 8,8% ($n=4$) детей. Неспецифическими признаками являлись: нарушения сердечного ритма и проводимости без нарушения кровообращения (73,3%; $p=33$). Системный синдром и миалгии с кожными проявлениями (мраморность, мелко папулезная или петехиальная сыпь) отмечались у 62,2% ($n=28$) детей. Нефротический синдром диагностировался у детей с СКВ при обострении основного заболевания, у одной девочки диагностирован гломерулонефрит, подтвержденный по результатам биопсии почек. Поражение ЖКТ отмечалось практически у всех детей и проявлялось хроническим гастритом, дуодено-гастральным или гастро-эзофагеальным рефлюксом. Специфические признаки поражения глаз при антифосфолипидном синдроме у детей не зафиксированы. Полученные результаты требуют продолжения исследования и наблюдения в этой области.

ОСОБЕННОСТИ СООТНОШЕНИЯ Т-ХЕЛПЕРОВ 1 И 2 ТИПОВ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ У ЖЕНЩИН С НЕВЫНАШИВАНИЕМ БЕРЕМЕННОСТИ РАННИХ СРОКОВ В АНАМНЕЗЕ И АНТИФОСФОЛИПИДНЫМ СИНДРОМОМ

**Кривенцова Т.А., Сотникова Н.Ю.,
Вторушина В.В., Бойко Е.Л.**

*ГУ «Ивановский НИИ материнства и детства
им. В.Н. Городкова МЗ РФ», Иваново, Россия*

Частота невынашивания беременности (НБ) в структуре акушерской патологии варьирует от 10 до 25%. Этот показатель достаточно стабилен несмотря на использование разнообразных комплексных методов лечения. В основе НБ, в большинстве случаев, лежат иммунологические нарушения, в том числе, аутоиммунного характера. Примером аутоиммунных процессов в генезе НБ яв-

ляется антифосфолипидный синдром (АФС), который, сочетаясь с другими нарушениями, осложняет их течение и может стать ведущим фактором, определяющим исход беременности. По данным литературы известно, что нормальное течение беременности является «феноменом преобладания Т-хелперов 2 типа, однако исследования последних лет ставят роль Th1 и Th2 типа под сомнение. В связи с этим целью данного исследования явилось установление особенностей соотношения Th1/Th2 типа в периферической крови у женщин с невынашиванием беременности ранних сроков в анамнезе и АФС.

Обследовано 35 женщин в возрасте от 19 до 38 лет с НБ ранних сроков (до 12 нед.). На основании анамнеза и клинико-лабораторных данных женщины были разделены на 2 группы: I группа – 23 пациентки с НБ ранних сроков и АФС (средний возраст женщин составил $27,47 \pm 1,08$ лет); II группа – 12 пациенток с НБ ранних сроков без АФС ($27,42 \pm 1,68$ лет). В контрольную группу вошли 11 соматически здоровых женщин с ненарушенной фертильной функцией ($25,55 \pm 0,63$ лет). Материалом для исследования служила гепаринизированная венозная кровь. Соотношение Th1/Th2 оценивали методом проточной цитометрии по внутриклеточному синтезу IFN γ и IL-4; волчаночный антикоагулянт определяли клотинговым методом с использованием наборов StacLOT LA (Diagnostica Stago).

Полученные нами данные показали, что в группе женщин с НБ ранних сроков и АФС в популяции Т-хелперов наблюдалось значительное снижение клеток, продуцирующих IL-4 ($p<0,01$) на фоне тенденции к снижению Т-хелперов, продуцирующих IFN γ ($p>0,05$) по сравнению с показателями контрольной группы, что приводило к изменению соотношения в пользу Th1 лимфоцитов. В группе женщин с НБ и АФС соотношение Th1/Th2 составило $2,28 \pm 1,04$, что обуславливает сдвиг в дифференцировке Т-хелперов в сторону Th1 клеток. Содержание Т-хелперов, продуцирующих IFN γ и IL-4 в популяции CD4 $^{+}$ лимфоцитов в группе женщин с НБ ранних сроков без АФС не отличалось от аналогичных показателей контрольной группы ($p>0,05$). Соотношение Th1/Th2 составило $1,121 \pm 0,1$, что также демонстрирует сдвиг в сторону Th1 клеток. Нами был проведен сравнительный анализ содержания Th1 и Th2 типа в зависимости от наличия или отсутствия АФС. При этом достоверных различий в данных группах выявлено не было ($p>0,05$). Соотношение Th1/Th2 также достоверно не различалось между собой, при этом по сравнению с параметрами группы контроля в обеих группах наблюдался сдвиг в сторону Th1 клеток ($p<0,01$ у женщин II группы, у женщин I группы достоверность не доказана, по-видимому, ввиду разной численности групп).

Таким образом, иммунологические изменения при НБ имеют сходную направленность, но выраженность их зависит от наличия или отсутствия АФС. Максимальные изменения наблюдаются в группе женщин с НБ ранних сроков и АФС, минимальные – в группе с НБ ранних сроков без АФС. Так, у женщин I группы снижение уровня Th2, вероятно, может приводить к относительному преобладанию Th1 клеток и повышенной выработке ими провоспалительных цитокинов, которые вызывают повреждение эндотелия и активацию процессов коагуляции, которым по современным представлениям отводится большая роль в развитии АФС. Гиперфункция Т-хелперов 1 типа ведет к каскаду местных патологических реакций с активацией клеточного иммунного ответа, приводящих

к невынашиванию беременности. Активация Th1 лимфоцитов приводит к развитию избыточно выраженных воспалительных реакций в эндометрии даже в условиях низкой концентрации, а особенно при персистенции инфекционного агента, что нарушает нормальные межклеточные взаимодействия и может служить причиной неполноценной имплантации.

Работа поддержана грантом Президента РФ НШ-2245.2003.4.

ЭКСПРЕССИЯ мРНК ПРО- И АНТИАНГИОГЕННЫХ ФАКТОРОВ И ИХ РЕЦЕПТОРОВ В МАКРОФАГАХ МЫШЕЙ В ДИНАМИКЕ РОСТА ОПУХОЛИ ГЕПАТОМА 22А

Крылов А.В., Киселева Е.П., Людино В.И.

ГУ НИИ экспериментальной медицины РАМН, Санкт-Петербург, Россия

Макрофаги играют важную роль в процессе ангиогенеза. При различных патологических состояниях и, в том числе, при росте опухоли они способны секретировать ряд про- и антиангиогенных факторов, непосредственно влияющих на рост сосудов. Известно, что растущая опухоль зависит от роста сосудов достигнув уже трех миллиметров в диаметре. К настоящему моменту регуляция про-, либо антиангиогенной активности макрофагов в процессе роста опухоли остается слабо изученной.

Целью настоящей работы послужило исследование ангиогенных свойств макрофагов в динамике роста сингенной перевиваемой опухоли гепатома 22А. Работу проводили на резидентных перитонеальных макрофагах мышей линии СЗНА. Методом обратной транскрипции и последующей ПЦР со специфическими праймерами оценивали экспрессию мРНК проангиогенного фактора VEGF, антиангиогенного фактора TSP-1, а также рецепторов для VEGF первого и второго типа (VEGFR1 и VEGFR2). Мышам подкожно инокулировали 10^5 жизнеспособных клеток опухоли. На 1, 7, 14, 21, 28 и 35 сутки опухолевого роста мышей убивали. Из монослоя перитонеальных макрофагов выделяли суммарную РНК для оценки уровня экспрессии мРНК интересующих факторов. В качестве внутреннего стандарта прохождения обратной транскрипции использовали β -актин. Результаты оценивали по степени интенсивности окрашивания электрофоретических полос с помощью программы scnipage. На каждом сроке исследовали по 8 опытных и контрольных животных. Результаты обрабатывали статистически с помощью критерия t Стьюдента.

Результаты исследований показали достоверное усиление экспрессии мРНК VEGF в макрофагах по сравнению с контролем только на 35 сутки исследования. Экспрессия мРНК данного фактора не менялась на более ранних сроках. Также была показана стимуляция экспрессии мРНК TSP-1 на 14-е и 28-е сутки роста опухоли. Вместе с тем, на 14-е сутки после инокуляции опухоли усиливалась и экспрессия мРНК VEGFR1. Не удалось обнаружить изменения в экспрессии мРНК VEGFR2 в макрофагах на всех сроках исследования.

Усиление синтеза мРНК TSP-1 макрофагами на 14 и 28-е сутки исследования может свидетельствовать об усилении их антиангиогенной активности. В то же время, стимуляция экспрессии мНУР проангиогенного фактора VEGF на поздних сроках роста опухоли может говорить о приобретении этими клетками проангиогенного фенотипа.

Работа поддержана грантами РФФИ №03-04-49186 и НШ-540.2003.4.

РОЛЬ ГОРМОНОВ БЕРЕМЕННОСТИ В КОНТРОЛЕ АПОПТОЗА И ПРОЛИФЕРАТИВНОЙ АКТИВНОСТИ Т-ЛИМФОЦИТОВ

Куклина Е.М.¹, Ширшев С.В.¹, Ярилин А.А.²

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

²ГНЦ – Институт иммунологии МЗ РФ, Москва, Россия

Беременность сопровождается существенным изменением функциональной активности Т-лимфоцитов. Потенциальным способом контроля Т-клеточных реакций в этот период является регуляция двух взаимосвязанных процессов – пролиферации и апоптоза. Учитывая, что баланс между апоптозом и пролиферацией определяет численность Т-клеточной популяции и эффективность активации Т-лимфоцитов в ходе иммунного ответа, исследование факторов и механизмов, участвующих в регуляции этих процессов, является актуальной проблемой репродуктивной иммунологии.

Целью настоящей работы было изучение способности основных репродуктивных гормонов – хорионического гонадотропина (ХГ), эстрадиола, прогестерона, а также их физиологических сочетаний, соответствующих разным периодам беременности, – индуцировать и/или модулировать апоптоз и пролиферативную активность интактных и митоген-индуцированных Т-лимфоцитов человека.

Материалы и методы. В работе использовали фракционированные Т-лимфоциты периферической крови небеременных женщин репродуктивного возраста. Пролиферативную активность оценивали по включению [³H]тимидина, а апоптоз – путем цитофлуориметрического определения процента гиподиплоидных клеток в пробе после их фиксации и окрашивания йодидом пропидия.

Основные результаты. Показано, что исследуемые гормоны ни по отдельности, ни в физиологических сочетаниях не обладают самостоятельными апоптотическими эффектами в отношении интактных Т-лимфоцитов. Активационный апоптоз этих клеток статистически значительно усиливался высокой дозой ХГ (100 МЕ/мл), характерной для I триместра беременности, однако на фоне действия стероидных гормонов этот эффект не проявлялся. Интересно отметить, что хотя ни один из гормонов в дозах, соответствующих III триместру беременности, не оказывал влияния на ФГА-индуцированный апоптоз Т-лимфоцитов, их сочетание вызывало существенное снижение этого показателя. Пролиферативная активность Т-лимфоцитов также эффективно регулировалась репродуктивными гормонами. Так, спонтанная пролиферация клеток статистически значительно усиливалась высокой дозой эстрадиола (10 нг/мл), характерной для III триместра, а также сочетанием высоких доз стероидных гормонов с низкой дозой ХГ, соответствующим данному периоду беременности. В то же время, за исключением высокой дозы прогестерона (100 нг/мл), все исследуемые гормоны, как по отдельности, так и в сочетаниях, достоверно подавляли ФГА-индуцированную пролиферацию лимфоцитов. В целом, гормоны репродукции, как правило, стимулировали (спонтанную) или угнетали (ФГА-индуцированную) пролиферативную активность Т-лимфоцитов, не оказывая влияния на апоптоз этих клеток. В том случае, когда гормон регулировал оба показателя (ХГ 100 МЕ/мл), его эффекты были реципрокны: ХГ усиливал ак-

тивационный апоптоз Т-лимфоцитов, но ингибировал пролиферативный ответ на ФГА.

Заключение. Способность изученных репродуктивных гормонов модулировать апоптоз и пролиферацию Т-лимфоцитов, по-видимому, вносит вклад в изменение иммунного статуса организма при беременности. Тонко регулируя баланс между апоптозом и пролиферацией Т-клеток, гормоны обеспечивают определенный уровень их активации, оптимальный для разных периодов гестации.

МЕХАНИЗМЫ УЧАСТИЯ Т-КЛЕТОК В ПАТОГЕНЕЗЕ АУТОИММУННОЙ ПУЗЫРЧАТКИ

Лысенко А.А., Свищевская Е.В., Матушевская Е.В.¹

*Институт Биоорганической Химии им.М.М.Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН,
¹Российский Государственный Медицинский Университет, Москва, Россия*

Введение. Пузырчатка является аутоиммунным заболеванием, при котором в сыворотке больных выявляются антитела, направленные против белков межклеточной адгезии десмоглеинов (ДСГ)1 и 3. Пузырчатка является генетически детерминированным заболеванием. Известно, что антитела к ДСГ3 вызывают акантолиз в эпидермисе кожи. Однако, достаточного высокого уровня антител к ДСГ3, наблюдаемый у близких родственников больных, не приводит к развитию заболевания, несмотря на сходный генотип. Семейной формы пузырчатки не наблюдается.

Цель. В данной работе была выдвинута и проверена гипотеза о критической роли аутореактивных Т-клеток в иницировании заболевания. Известно, что аутореактивные клоны Т-клеток формируются и в норме. В большинстве случаев они находятся под контролем механизмов периферической толерантности, одним из которых является наличие барьера между тканями и кровеносной системой. Для попадания в кожу Т-клеткам требуется преодоление эндотелиального барьера, которое обеспечивается за счет взаимодействия между молекулами адгезии CLA и E-селектинами. Отсутствие или низкая экспрессия этих молекул гарантирует отсутствие контакта между Т-клетками, направленными против ДСГ3, и кератиноцитами кожи, экспрессирующими этот белок. Нарушение баланса в экспрессии адгезивных молекул, особенно E-селектина, может привести к преодолению толерантности и развитию пузырчатки.

Методы. В данной работе мышам линий СВА, BALB/с и С57BL, семикратно иммунизированным белком ДСГ3, ввели подкожно *Micrococcus lysodeikticus* (ML).

Результаты. Попадание бактерий в организм вызывает активацию эндотелия и повышает экспрессию E-селектинов в месте введения. До введения ML на коже иммунизированных ДСГ3 мышей патологии выявлено не было. Через сутки после введения ML на коже мышей появились пузыри, характерные для пузырчатки.

Выводы. Таким образом, показано, что наличие даже большого пула аутореактивных Т-клеток не приводит к развитию заболевания до тех пор, пока уровень экспрессии E-селектинов остается низким. Спровоцировать заболевание могут различные факторы такие, как, например, укусы насекомых, что наблюдается в случае эндемичной формы пузырчатки Fogo selvagem.

АДРЕНАЛИН-ОПОСРЕДОВАННАЯ ЭКСПРЕССИЯ БЕЛКОВ ТЕПЛОвого ШОКА 70 В ЛИМФОИДНЫХ КЛЕТКАХ

Мурашко Д.А., Пономарев А.Д., Сапожников А.М.

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

Белки теплового шока играют важную роль в физиологии стресса. Появляясь в ответ на стрессовые стимулы различной природы, белки теплового шока оказывают протективный эффект как по отношению к самой клетке, так и к клеточной популяции в целом. Одним из главных представителей семейства белков теплового шока является белок с молекулярной массой 70 кДа – БТШ70. Этот протеин имеет присутствующую в клетке в нормальных условиях конститутивную и появляющуюся при стрессе индуцибельную формы. Экспрессия БТШ70 в клетках тесно связана с процессами апоптоза и клеточной активации. Вырабатываемый клетками мозговой части надпочечников адреналин известен в качестве основного гормона стресса. Попадая в кровоток, этот гормон оказывает воздействие на различные органы и ткани, быстро перестраивая метаболизм в соответствии с изменившимися условиями окружающей среды. Действие адреналина зависит от типа и количества представленных на клетке адренорецепторов, поэтому для разных тканей его влияние может быть различным. Кроме имеющего системное действие адреналина в организме млекопитающих есть другие действующие на адренорецепторы гормоны, выделяемые в группу катехоламинов. Исследование воздействия адреналина и других катехоламинов на экспрессию БТШ лимфоидными клетками может быть интересно для лучшего понимания механизмов нейроэндокринной регуляции иммунной системы млекопитающих.

В нашей работе мы исследовали влияние адреналина на экспрессию БТШ70 в лимфоидных клетках мыши. В качестве модели мы использовали тимоциты и клетки Т-клеточной линии CTLL-2. Содержание внутриклеточных белков определяли с помощью метода проточной цитофлуориметрии на приборе Coulter XL методом непрямой иммунофлуоресценции с применением одноцветного окрашивания. Использовали моноклональные антитела против БТШ70, антитела отдельно против конститутивной и индуцибельной форм БТШ70, антитела против БТШ25 и БТШ90 мыши. В отдельных экспериментах наряду с катехоламинами были использованы специфические ингибиторы фосфолипазы C (U-73122) и протеинкиназы A (H-89).

В нашей модели при воздействии на клетки физиологическими концентрациями катехоламинов уровень внутриклеточного содержания БТШ70 претерпевает значительные изменения. Значительно снижаясь уже через несколько минут после воздействия гормонами адреналином или его аналогами, уровень БТШ70 продолжает оставаться низким еще в течение двух часов и затем достаточно быстро возрастает, многократно превышая исходные значения через четыре часа после воздействия. При исследовании отдельно конститутивной и индуцибельной форм БТШ70 нами была получена различная кинетика ответа на стресс. Так, если содержание индуцибельной формы в наших экспериментах остается низким на протяжении двух часов после стимуляции, содержание конститутивной формы характеризуется плавным увеличением сразу после первоначального снижения. Содержа-

ние БТШ25 и БТШ90 в клетках после воздействия адреналином в нашей модели не претерпевает значительных изменений и во многих случаях не выходит за пределы статистической погрешности. Специфический ингибитор фосфолипазы С снижает вызванную катехоламинами экспрессию БТШ70 и не влияет на экспрессию БТШ70 в контрольных клетках. Специфический ингибитор протеинкиназы А не влияет на экспрессию БТШ70 под действием адреналина.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 03-04-49052).

МЕХАНИЗМЫ РЕГУЛЯЦИИ КАТИОН-ТРАНСПОРТИРУЮЩИХ КАНАЛОВ В ПЛАЗМАТИЧЕСКОЙ МЕМБРАНЕ Т-ЛИМФОЦИТОВ И ДРУГИХ КЛЕТОК КРОВИ

Негуляев Ю.А., Семенова С.Б., Васильева И.О., Морачевская Е.А.

*Институт цитологии РАН,
Санкт-Петербург, Россия*

В решении проблем внутриклеточной сигнализации важное место занимает исследование ионных каналов – ион-транспортующих мембранных белков. Получены данные, свидетельствующие об особой значимости катионных каналов плазматической мембраны, принадлежащих к семействам белков DEG/epac и TRP, вероятных участников в реализации ионных механизмов передачи сигнала. Повышение концентрации свободного кальция в цитоплазме является одним из ключевых клеточных процессов, ведущих к активации Т-лимфоцитов и вызывающих пролиферативный ответ, а также секрецию лимфокинов. Наша работа направлена на изучение функциональных свойств и путей регуляции катион-переносящих каналов, участвующих в обеспечении ионного гомеостаза и формировании кальциевого ответа в клетках крови миелоидного и лимфоидного ряда. Основные эксперименты выполнены с использованием различных вариантов патч-кламп техники: суть этого метода – электрофизиологическая регистрация активности одиночных каналов при отведении трансмембранных токов в условиях локальной фиксации потенциала. Использованы также анализ изображений и данные об экспрессии каналообразующих белков, полученные с помощью метода ОТ-ПЦР. Эксперименты проводили на нормальных клетках (макрофаги мыши и крысы, Т-лимфоциты человека, полученные от здоровых доноров) и на постоянных клеточных линиях трансформированных клеток (Jurkat, K-562, U937, Коллекция клеточных культур, Институт цитологии РАН). Идентифицированы и детально изучены несколько основных типов селективных каналов, активация которых может быть важнейшей составляющей входа катионов из внеклеточной среды в цитоплазму: это (1) натрий-селективные каналы, (2) Са-проницаемые механочувствительные каналы и (3) катионные каналы, зависящие от внутриклеточного уровня кальция и магния. Идентификация на уровне функциональных характеристик одиночных каналов позволяет создать легко узнаваемый образ при поиске генов, кодирующих каналообразующие белки, вовлеченные в кальциевую и магниевую сигнализацию в клетках крови, и может в значительной мере ускорить изучение путей их регуляции. Так, сопоставление функциональных характеристик и проведенный ПЦР

анализ позволяют полагать, что каналообразующий белок TRPV6 является вероятным молекулярным коррелятом эндогенных магний-зависимых токов в клетках лейкемии человека K-562. При поиске физиологически значимых регуляторных путей выявлена определяющая роль организации и динамики кортикального актинового цитоскелета в модуляции активности и свойств исследуемых типов нативных каналов. (1) Установлено, что сборка-разборка примембранных микрофиламентов непосредственно контролирует процессы активации и инактивации натриевых каналов в клетках K-562. (2) Обнаружены существенные изменения проводящих свойств механочувствительных каналов при разборке F-актина. (3) Показано участие структур кортикального цитоскелета в функционировании катионных каналов в Т-лимфоцитах.

Можно утверждать, что функциональная связь каналообразующих мембранных белков со структурами цитоскелета имеет универсальный характер, но реализуется различным образом. Результаты позволяют полагать, что именно реорганизация кортикальной актиновой сети может быть ключевым звеном в цепях передачи сигнала с участием катионных каналов в клетках крови.

Работа выполнена при поддержке РФФИ (№ 04-04-49630-а), Программы «Научные школы» (НШ-2178.2003.4) и Программы Президиума РАН «Молекулярная и клеточная биология».

РОЛЬ ВНЕНЕРВНОЙ ХОЛИНЕРГИЧЕСКОЙ СИСТЕМЫ ЛИМФОЦИТОВ В СТРЕССИНДУЦИРОВАННОМ ЯЗВООБРАЗОВАНИИ В ЖЕЛУДКЕ КРЫС ЛИНИИ WISTAR

Нежинская Г.И., Назаров П.Г., Сапронов Н.С.

*НИИ экспериментальной медицины,
Санкт-Петербург, Россия*

Применение холинолитиков в качестве противоязвенных препаратов объясняется их влиянием на основные звенья патогенеза данного заболевания. Однако контролируемых исследований, доказывающих эффективность холинолитиков для профилактики так называемых «стрессовых» язв желудка (у больных с тяжелыми ожогами, черепно-мозговыми травмами, после полостных операций и т.д.), не проводилось. Неизвестна роль вегетативной холинергической системы лимфоцитов в этих процессах.

Целью работы являлось исследование влияния метацина на цитокино- и антителопродуцирующую активность лимфоцитов, а также изучение на модели водонепроницаемого стресса (ВИС) возможностей профилактики метацином «стрессовых» язв желудка. В опытах *in vitro* показано, что метацин мало влиял на продукцию таких цитокинов, как IL-1Ra (антагониста рецептора IL-1) и IL-4. Вместе с тем, препарат существенно увеличивал продукцию IL-1 ($73 \pm 1,6$ пг/мл – в опыте, $1 \pm 0,03$ пг/мл – в контроле), спектр действия которого, как известно, затрагивает усиление пролиферации В-лимфоцитов и их дифференцировку в антителообразующие клетки (АОК). На модели первичного иммунного ответа подтверждено, что в индуктивную фазу (5-е сутки) метацин увеличивал содержание АОК (на 10^6 жизнеспособных спленоцитов) до 600 ± 20 по сравнению с 400 ± 15 в контроле, а в продуктивную фазу (14-е сутки) – до 800 ± 40 против 300 ± 20 , соответственно. У крыс, подвергнутых ВИС, на 5-е и 14-е сутки после стимуляции антителопродуцирующей активности β -лимфоцитов метацином, определял-

ся неодинаковый противоязвенный эффект ($2,2 \pm 0,1$ и $0,7 \pm 0,1$ балла, соответственно, по сравнению с $3,3 \pm 0,2$ балла в контроле). Можно предполагать, что увеличение концентрации полиреактивных антител мукозального и системного иммунитета оказывает менее выраженную противоязвенную защиту, по сравнению с протективным эффектом специфических антител, вырабатываемых в продуктивную фазу иммунного ответа. В то же время противоязвенное действие самого метацина (введение за 30 мин до ВИС) оценивалось в $1,3 \pm 0,2$ балла. Таким образом, иммунологическая защита, связанная со стимуляцией метацином В-лимфоцитов, более эффективна по сравнению с непосредственным противоязвенным действием метацина, обусловленным блокадой М-холинорецепторов желудка.

КОРРЕКЦИЯ ВАЗОПРЕССИНОМ ПОСЛЕДСТВИЙ ВИТАЛЬНОГО СТРЕССА У САМОК КРЫС

Огурцов Р.П., Авалиани Т.В., Пузырева В.П., Белобокова Н.К., Цикунов С.Г., Попов В.Г., Белокоскова С.Г.

ГУ НИИ экспериментальной медицины РАМН, Санкт-Петербург, Россия

В клинике нервных болезней было показано, что использование вазопрессина положительно влияет на процессы памяти, речи и эмоциональное состояние больных (Белокоскова и соавт., 2002). Витальный стресс вызывает не только значительные и долго сохраняющиеся функциональные расстройства в организме, но у особей женского пола последствия психогенной травмы оказывают негативное воздействие на развитие потомства.

Цель данного исследования состояла в разработке способов коррекции последствий витального стресса самок —будущих матерей на иммунный и поведенческий статус их потомства.

Методика. За месяц до беременности самкам Вистар на стадии проэструс-эструс наносили психогенную травму — угроза жизни и сопереживание гибели сородичей от действия хищника (тигровый питон). Одна часть самок в течение первых 5 дней после травмы ежедневно получала интраназально адиуретин CD в дозе $2 \cdot 10^{-7}$ мг. По окончании курса проводилось тестирование в открытом поле (ОП). Через месяц самки подсаживались к самцам. Через 3 месяца после травмы (в промежутке следовали роды и вскармливание потомства) у крыс обеих групп и у их одномесячного потомства определяли активность естественных киллеров (ЕК) и лимфоцитов на Т-клеточные митогены, а также проводили исследование в ОП.

Результаты. У крыс матерей обеих групп через 3 месяца после психогенной травмы спонтанная активность Т-лимфоцитов оставалась выше интактного контроля. У самок, принимавших вазопрессин (группа 2), способность реагировать на Т-клеточные митогены и активность ЕК восстанавливалась, в отличие от группы 1, у которой активность ЕК была снижена и отсутствовала способность реагировать на Т-клеточные митогены. У одномесячного потомства крыс с психогенной травмой активность ЕК была снижена, спонтанная миграционная активность повышена и отсутствовала способность реагировать на Т-клеточные митогены. Вазопрессин оказывал положительный эффект только на особей мужского пола, восстанавливая активность ЕК и миграционную активность лейкоцитов.

Повышенная тревожность самок-матерей в ОП купировалась вазопрессином как сразу после курса приема, так и через 3 месяца после травмы. Исследовательская и двигательная активность в обоих случаях была снижена.

Стресс до беременности вызывает нарушение исследовательской деятельности и страховое поведение прежде всего у самок. У потомства группы 2 эмоциональные реакции соответствовали норме у самцов, но не у самок, исследовательское поведение улучшалось вне зависимости от пола.

Таким образом, вазопрессин снижает патогенное воздействие витального стресса как у самих матерей, так и у их потомства, прежде всего у самцов.

ИЗУЧЕНИЕ АНТИГЕННОЙ СТРУКТУРЫ ТИРЕОГЛОБУЛИНА У ПРЕДСТАВИТЕЛЕЙ РАЗНЫХ ТАКСОНОВ ПОЗВОНОЧНЫХ ЖИВОТНЫХ

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

Центральный научно-исследовательский рентгено-радиологический институт МЗ РФ, Санкт-Петербург, Россия

Главным биосинтетическим продуктом щитовидной железы является тиреоглобулин (ТГ). Показано, что высокая степень гомологии первичной структуры ТГ обеспечивает выполнение этим белком сходных функций у филогенетически отдаленных видов. Однако антигенная структура молекулы ТГ мало изучена. На молекуле ТГ человека идентифицировано более 40 антигенных детерминант, причем среди них имеются как видоспецифичные, так и эволюционно консервативные эпитопы, общие для ТГ животных разных видов.

Целью настоящего исследования было изучение антигенной структуры ТГ позвоночных животных разных видов, при помощи панели из 54 МКАТ против ТГ человека, полученной в нашей лаборатории. Для этого было необходимо: (i) изучить свойства полученных МКАТ; (ii) исследовать свойства эпитопов, распознаваемых данными МКАТ; (iii) изучить экспрессию различных эпитопов ТГ в ткани щитовидной железы животных разных видов.

Было изучено взаимодействие МКАТ с препаратами нормальной ткани щитовидной железы человека, собаки, кошки, мыши, курицы и голубя и препаратами ТГ быка, свиньи и крысы. Эпитопную и видовую специфичность МКАТ определяли путем конкурентного и непрямого ИФА. Экспрессию эпитопов ТГ на препаратах щитовидных желез различных видов животных исследовали иммуногистохимическими и иммунофлуоресцентными методами.

Показано, что 54 исследованных МКАТ способны распознавать на молекуле ТГ человека 45 различных пространственно изолированных антигенных детерминант.

Все эпитопы на молекуле ТГ можно разделить на три основные группы:

1. Видоспецифические для ТГ человека и не представленные на ТГ ни одного из исследованных видов животных ($n=10$);

2. Эпитопы, экспрессированные на ТГ млекопитающих, но отсутствующие на ТГ птиц ($n=19$);

3. Наиболее консервативные эпитопы, представленные как на ТГ млекопитающих, так и на ТГ птиц ($n=16$).

Следует отметить, что и вторая, и третья группа эпитопов оказались достаточно гетерогенными, поскольку

включали в себя как антигенные детерминанты, представленные на ТГ нескольких исследованных видов животных, так и наиболее консервативные эпитопы, экспрессированные на ТГ всех или почти всех исследованных видов животных.

Несмотря на высокую степень межвидовой гомологии ТГ было установлено, что антигенные детерминанты поразному представлены на ТГ различных видов животных, в том числе и близкородственных видов.

Существует представление, согласно которому в молекуле ТГ наиболее консервативными являются гормоногенные участки. Однако было показано, что среди полученных МКАТ ни одни не взаимодействовали с гормоногенными участками ТГ. Поэтому вполне вероятно, что на молекуле этого белка присутствуют высоко консервативные участки, которые не являются гормоногенными.

Таким образом, на молекуле ТГ человека идентифицировано и охарактеризовано 35 эволюционно консервативных и 10 видоспецифичных эпитопа.

ТН1/ТН2 ОТВЕТ ПРИ РАЗЛИЧНЫХ ВАРИАНТАХ ТЕЧЕНИЯ ИЕРСИНИОЗНОЙ ИНФЕКЦИИ

Попова О.В., Фомичев М.А., Гуляев М.М., Шепелева Г.К.

Московский государственный медико-стоматологический университет, Научно-исследовательский медико-стоматологический институт, Москва, Россия

Введение. Актуальность проблемы иерсиниозов обусловлена неблагоприятными исходами острых форм. Более 15% случаев острой иерсиниозной инфекции заканчивается хронизацией, развитием реактивных артритов, узловой эритемы, синдрома Рейтера. Важную роль в элиминации внутриклеточных возбудителей инфекций и в последующем развитии иммунопатологических реакций играет Т-клеточное звено и в особенности сбалансированность Th1/Th2 ответа.

Цель: сравнить уровень внутриклеточных цитокинов и оценить их прогностическую значимость у больных с вторично-очаговой и генерализованной формой иерсиниозной инфекции.

Материалы и методы. Исследования проведены в 2 группах больных с иерсиниозной инфекцией: 1 – больные генерализованной формой иерсиниоза, с гладким циклическим течением (12 чел.); 2 – пациенты с развитием вторично-очаговых форм иерсиниоза (артритический вариант, синдром Рейтера) (7 чел.). Диагноз иерсиниоз поставлен клинически и подтвержден обнаружением антител к *Y. enterocolitica* сероваров О:3, О:9 в РНГА или РА. Группу контроля составили практически здоровые лица в возрасте 18–30 лет (10 чел.).

Иммунологическое исследование включало изучение клеточного иммунитета с помощью моноклональных антител, измерение содержания внутриклеточных цитокинов IFN γ , IL-2, IL-4 на проточном лазерном цитофлуориметре; проводилось типирование пациентов по HLA B27 антигену, определение СРБ в крови методом латекс-агглютинации. Иммунологическое исследование проводилось при поступлении больного в стационар, каждые 10–14 дней нахождения в стационаре, при выписке; срок амбулаторного наблюдения за пациентами – до 1 года.

Результаты исследования показали, что практически у всех больных на фоне лейкоцитоза наблюдалась лимфопения, более выраженная у пациентов из второй группы. Имелась тенденция к повышению Т-лимфоцитов, наблюдалось уменьшение процентного содержания Т-хелперов и повышение процентного содержания CD8⁺-клеток, более резко выраженное у пациентов с вторично-очаговыми формами иерсиниоза, у трети этих больных отмечалась инверсия ИРИ. У больных, как в первой, так и во второй группе наблюдалось практически одинаковое увеличение содержания IFN γ -продуцирующих клеток, стимулированных РМА и иономицином, по сравнению с группой доноров. У больных 1-й группы наблюдалось достоверное увеличение IL-2 – продуцирующих клеток (10,1%) по сравнению с больными из второй группы (3,5%). Вместе с тем уровень IL-4 был достоверно выше у больных с вторично-очаговыми формами иерсиниоза (2,4%) по сравнению с больными с гладким неосложненным течением инфекции (0,95%).

Все больные первой группы были отрицательны по HLA B27, С-реактивный белок определялся у части больных лишь в остром периоде заболевания. Из 7 больных с системными проявлениями 4 человека были положительны по HLA B27, у них длительно определялся С реактивный белок в крови.

Заключение.

- Гладкое неосложненное течение иерсиниозной инфекции коррелирует с активацией Т лимфоцитов-хелперов и дифференциацией их по первому типу, что проявляется в увеличении активатора – регулятора Т клеточного ответа IL-2.
- Вторично-очаговая форма иерсиниозной инфекции характеризуется повышением IL-4 содержащих клеток, что свидетельствует о течении инфекции по Th-2 типу.
- Больные иерсиниозной инфекцией с суставным синдромом должны быть типированы по HLA B27 антигену для прогнозирования исхода заболевания и выбора тактики ведения больного.

НАРУШЕНИЕ БАЛАНСА ПРО- И ПРОТИВОВОСПАЛИТЕЛЬНЫХ ЦИТОКИНОВ ПРИ СИНДРОМЕ ЦЕНТРАЛЬНОЙ ИММУНОСУПРЕССИИ

Цухальский А.Л., Шмарина Г.В.

Медико-генетический научный центр РАМН, Москва, Россия

Обычно развитие синдрома центральной иммуносупрессии (СЦИ) связывают с серьезной травмой головного мозга, политравмой, ожоговой болезнью или тяжелым психогенным стрессом. Однако есть основания полагать, что СЦИ может быть следствием длительно персистирующего в организме очага хронического воспаления (хроническая инфекция, генерализованный опухолевый процесс). В этом случае пусковым механизмом СЦИ является накопление в крови большого количества провоспалительных цитокинов. При превышении в крови пороговых концентраций эти цитокины способны преодолевать в преоптической области гематоэнцефалический барьер и стимулировать продукцию кортикотропин-релизинг-гормона, который в свою очередь стимулирует продукцию АКТГ гипофизом. В результате происходит усиление синтеза кортизола надпочечниками и стимуляция симпатической нервной системы с высвобождением

нием катехоламинов (адреналина и норадреналина). Глюкокортикоиды и катехоламины активно вмешиваются в течение воспалительного процесса. Главными мишенями для них являются моноциты/макрофаги и лимфоциты Th1. В результате тормозится продукция макрофагами провоспалительных цитокинов (IL-1 β , TNF α , IL-12) и стимулируется синтез противовоспалительного цитокина IL-10, который вместе с кортизолом и норадреналином подавляет продукцию IL-2 и IFN γ лимфоцитами Th1. Таким образом, активация гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой оси (ГГНО) и симпатической нервной системы снижает интенсивность воспалительного процесса, предупреждая тем самым повреждение внутренних органов медиаторами воспаления. Однако в некоторых случаях, например при хронической инфекции, подавить реакцию воспаления не удается. В очаг воспаления продолжается рекрутирование лейкоцитов, и синтез цитокинов остается высоким, что в конечном итоге приводит к формированию порочного круга, при котором равновесие между про- и противовоспалительными механизмами оказывается нарушенным. При этом противовоспалительные агенты (глюкокортикоиды, катехоламины) существенно угнетают Th1-лимфоциты, практически не влияя на Th2. В результате образовавшегося сдвига в пользу Th2 имеет место повышенная продукция IL-4 и IL-5, которые являются медиаторами синтеза низкоаффинных антител В-лимфоцитами, что также способствует хронизации воспалительного процесса. До сих пор не существует надежных методов терапии при подобных состояниях. Использование обычных противовоспалительных препаратов (глюкокортикоидов, нестероидных противовоспалительных препаратов) мало эффективно и в ряде случаев может лишь усугубить ситуацию.

Мы исследовали маркеры воспаления у больных легочной формой муковисцидоза (МВ) в процессе хронической терапии малыми дозами кларитромицина (250 мг через день). Длительность наблюдения составила 2 года (1 год до введения кларитромицина и 1 год в процессе лечения). Содержание цитокинов и АКТИГ в образцах мокроты и/или плазмы определяли с помощью коммерческих иммуноферментных наборов. Пролиферативный ответ лимфоцитов оценивали по включению тимидина [^3H] в 72-часовой культуре мононуклеаров периферической крови, стимулированных ФГА. У больных МВ были обнаружены следующие признаки ЦИС: высокое содержание АКТИГ в крови, высокие уровни IL-10, IL-4, TNF α , низкий IFN γ , а также выраженная нейтрофильная инфильтрация. После лечения наблюдалось значимое снижение провоспалительных цитокинов TNF α и IL-8. Кроме того имело место значимое снижение IL-4 и повышение IFN γ , что привело к заметному возрастанию показателя IFN γ /IL-4. Важно отметить существенное повышение пролиферативного ответа лимфоцитов периферической крови на ФГА, что указывает на ослабление супрессии Th1-лимфоцитов со стороны глюкокортикоидов и катехоламинов. Таким образом, нарушение баланса про- и противовоспалительных цитокинов может приводить к развитию СЦИ у больных с длительно персистирующим очагом хронической инфекции. Макролидные антибиотики не только снижают интенсивность местного воспалительного процесса, но и обладают выраженным системным действием, которое, возможно, связано с торможением активности ГГНО и симпатической нервной системы.

ГЛИКОЗИЛИРОВАНИЕ КЛЕТОЧНОЙ МЕМБРАНЫ АПОПТОТИЧЕСКИХ ТЕЛЕЦ ПРИВОДИТ К ИЗМЕНЕНИЮ АКТИВНОСТИ МАКРОФАГОВ

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

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

Введение. Макрофаги представляют собой первичный противоопухолевый барьер. Привлекательность использования макрофагов в противораковой терапии связана с тем, что они способны различать и удалять трансформированные клетки независимо от экспрессии на них специфических антигенов. Лектины, экспрессирующиеся на макрофагах, с одной стороны, и изменение гликозилирования клеточной мембраны, с другой стороны, могут приводить к изменению функции макрофагов. Ранее нами было показано, что T $_{\text{вв}}$ -дисахарид и 3-сиалил-лактоза, входящие в состав олигосахаридных цепей гликопротеинов и гликолипидов апоптотических телец (АпТ), участвуют в лектин-опосредованном фагоцитозе макрофагами, полученными из мононуклеарной фракции больных раком молочной железы. Не исключено, что введение этих углеводных фрагментов в апоптотические тельца может способствовать созданию дополнительных сайтов связывания для макрофагальных лектинов или повлиять на секрецию макрофагами цитокинов в результате презентации гликолипида T $_{\text{вв}}$ -OR T-клеточному рецептору TCR $\alpha\beta$.

Целью данной работы было: 1) исследование терапевтического действия инъекции АпТ, нагруженных T $_{\text{вв}}$ -OR, на выживаемость мышей А/Sn с перевитым раком молочной железы *in vivo*; 2) изучение возможного механизма действия таких апоптотических телец, например, на фагоцитоз макрофагов и способность макрофагов секретировать TNF α *in vitro*.

Методы. Фенотип перитонеальных макрофагов мыши подтверждали цитофлюориметрией с помощью соответствующих антител; апоптоз индуцировали инкубацией полученной краткосрочной культуры карциномы рака молочной железы с 10 мм бутиратом натрия. Конденсацией аминопропилгликозидов с производными ди-олеил-фосфатидилэтаноламина (DOPE) были синтезированы неогликолипиды: T $_{\text{вв}}$ Gal β 1-3Galnac β -OR (T $_{\text{вв}}$ -OR) и Gal β 1-4Glc-OR (Lac-OR). Встраивание T $_{\text{вв}}$ -OR оценивали методом цитофлюориметрии и ИФА с помощью моноклональных антител, узнающих T $_{\text{вв}}$ -эпитоп. Цитотоксическую активность макрофагов определяли методом ИФА по уменьшению алкалин-фосфатазной активности опухолевых клеток, а секрецию IFN γ с помощью моноклональных антител к IFN γ методом ИФА. В экспериментах *in vivo* терапия апт проводилась на 8-ой день после инокуляции клеток рака молочной железы. Ежедневно измеряли рост опухоли и выживание мышей.

Результаты. 1. Синтетические гликолипиды встраивались в мембрану АпТ. Максимальное количество встроенного гликолипида составляло 60% от количества гликолипида, взятого в опыт; гликолипид встраивался в мембрану в течение первых 3-х часов;

2. АпТ, нагруженные T $_{\text{вв}}$ -OR, были введены А/Sn мышам с перевитым раком молочной железы. Контрольным животным были введены интактные АпТ и АпТ со встроенным гликолипидом Lac-OR. Как видно из таблицы,

ТАБЛИЦА. ВЫЖИВАЕМОСТЬ ЖИВОТНЫХ С ПЕРЕВИТЫМ РАКОМ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ ПОСЛЕ ВВЕДЕНИЯ АпТ

Группа животных	Выживаемость животных после инъекции, %	
	Через 11 недель	Через 16 недель
Нет АпТ	32	20
Интактные АпТ	40	20
АпТ, нагруженные Lac-OR	40	20
АпТ, нагруженные T _{ββ} -OR	100	60

инъекция АпТ, нагруженных T_{ββ}-OR, привела к значительному улучшению выживаемости мышей в этой группе (табл.).

3. В экспериментах *in vitro* был изучен возможный механизм терапевтического воздействия АпТ. Во-первых, введение T_{ββ}-OR в АпТ приводит к активации цитотоксической функции макрофагов, причем эффект действия зависит как от соотношения между макрофагами и АпТ, так и от соотношения между макрофагами и опухолевыми клетками. Во-вторых, инкубация макрофагов с АпТ, нагруженными T_{ββ}-OR, приводила к увеличению в 2 раза секреции макрофагами IFN γ .

Заключение. Таким образом, изменение углеводного паттерна АпТ может стать одним из способов терапии рака молочной железы путем модулирования активности макрофагов.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований – грант №04-04-49689.

ВЗАИМОСВЯЗЬ МЕЖДУ ИНФОРМАЦИОННОЙ СТРУКТУРОЙ БЕЛКА И РАСПОЛОЖЕНИЕМ В-КЛЕТОЧНЫХ ЭПИТОПОВ

Свирщевская Е.В., Алексеева Л.Г., Шевченко М.А., Некрасов А.Н., Куруп В.П.¹

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

¹Медицинский колледж Висконсина, Милуоки, США

Введение. При разработке вакцин важную роль играют носители антигенной информации, в качестве которых могут выступать гомогенаты микроорганизмов, полноразмерные основные белки из этих патогенов или короткие пептиды из этих белков. Вакцины на основе низкомолекулярных фрагментов белков являются предпочтительными при индукции ответа на белки, гомологичные белкам человека. Использование полноразмерных молекул для этих целей несет в себе опасность индукции нежелательных аутоиммунных реакций. Сложностью разработки пептидных вакцин является их низкая по сравнению с полноразмерными белками иммуногенность. Поиск путей повышения иммуногенности при сохранении специфичности ответа позволит разработать эффективные вакцины против аллергии, ряда аутоиммунных заболеваний и рака. При разработке противоаллергенных вакцин и вакцин, блокирующих формирование патогенных аутоантител, наиболее перспективными являются так называемые В-клеточные пептидные вакцины. В состав этих вакцин входят только строго определенные В-клеточные эпитопы белков, принимающих участие в патогенезе конкретного заболевания. Выбор пептидов, соответствующих таким эпитопам, является трудной научной задачей.

Цель и задачи. В данной работе проведен анализ взаимосвязи В-клеточных эпитопов с информационной структурой белков аллергенов из гриба *A.fumigatus* Asp f 2 и Asp f 3.

Материалы и методы. В-клеточные IgG связывающие эпитопы были определены с использованием сывороток мышей линий BALB/c 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 были определены с использованием сывороток крови больных аллергическим аспергиллезом. Расчет информационной структуры белков Asp f 2 и Asp f 3 проводился по методике и с параметрами, представленными в работе [1]. Данный метод позволяет выделять в последовательности белка независимые структурно-функциональные участки (IDIC-ассоциации), соответствующие в пространственной структуре белка структурным доменам, а также участки с повышенной устойчивостью элементов вторичной структуры (ADD⁺) и с повышенной конформационной подвижностью (ADD⁻).

Результаты. IDIC-диаграммы для белков Asp f 2 и Asp f 3 были сопоставлены с положением выявленных ранее В-клеточных эпитопов. Из 8 IgG эпитопов Asp f 2 и 8 эпитопов Asp f 3 десять (60%) попадали в ADD⁻ зоны, соответствующие гибким участкам молекул. Из 9 IgE эпитопов Asp f 2 и 7 эпитопов Asp f 3 – одиннадцать (70%) также попадали в эту же зону.

Выводы. Таким образом, вероятность того, что наиболее иммуногенные линейные В-клеточные эпитопы соответствуют конформационно подвижным участкам полипептидной цепи, составляет около 65%, что сравнимо с точностью других теоретических методов поиска антигенных детерминант. Эти данные позволят в дальнейшем облегчить поиск В-клеточных эпитопов, необходимых для создания иммуногенных вакцин.

Литература:

1. Nekrasov A.N. J. Biomol. Struct. Dyn., 2004, 21, 615-623.

ДИСБАЛАНС ПРОВосПалИТЕЛЬНЫХ ЦИТОКИНОВ (IL-1 β И TNF α) И ПРОТИВОВосПалИТЕЛЬНОГО IL-4 ПРИ ВОСПалИТЕЛЬНЫХ И ПРОЛИФЕРАТИВНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЯХ ГЛАЗ

Слепова О.С., Быковская Г.Н., Катаргина Л.А., Денисова Е.В., Новикова-Билак Т.А.

МНИИ глазных болезней им. Гельмгольца, Москва, Россия

Введение. Известно, что подъем уровня IL-1 β и/или TNF α в сыворотке крови у пациентов с эндогенными уве-

итами и диабетической ретинопатией (ДР) является патогенетически неблагоприятным фактором. Роль IL-4, традиционно относящегося к противовоспалительным цитокинам, изучена гораздо меньше.

Цель: оценить обоснованность противопоставления этих цитокинов по результатам их эффектов в условиях офтальмопатологии различной степени тяжести.

Материалы и методы. IL- β , IFN- α и IL-4 исследовали в сыворотке (ИФА) у 68 пациентов (8-45 лет): 26 чел. – с эндогенными увеитами (активными – 17 чел., в ремиссию – 9 чел.), из них у 8 имелись тяжелые пролиферативные осложнения; 42 больных инсулин зависимым сахарным диабетом с различными стадиями ДР.

Результаты. Выявлена корреляционная связь между продукцией IL-4 и IL-1 β ($r=0,638-0,761$; $p<0,01-0,05$), а также – IL-4 и IFN ($r=0,976$; $p=0,001$). Установлено, что при воспалительной патологии глаз умеренная продукция всех трех цитокинов (IL-1 – 100-125 пкг/мл, IFN – 55-60 пкг/мл; IL-4 – 70-80 пкг/мл) ассоциировалась с благоприятным течением и ремиссией увеита. При усугублении процесса (активная стадия, признаки пролиферативных изменений) наблюдалась гиперсекреция не только провоспалительных IL-1 (160-400 пкг/мл) и IFN (400-800 пкг/мл), но и IL-4 (400-600 пкг/мл). Эти наблюдения позволяют думать о синергизме действия трех цитокинов. Проявления антагонизма между IL-4 и провоспалительными медиаторами отмечались лишь при особо тяжелых увеитах (активных, с грубыми пролиферативными осложнениями). У таких больных выявлялось селективное накопление IL-1 (175-235 пкг/мл) и минимальные уровни IL-4 (15-30 пкг/мл). Близкие по сути данные получены в группе ДР. На субклинической стадии частота выявления IL-1 (54%), IFN (55%) и IL-4 (57%) была примерно одинаковой. Манифестации ДР предшествовала гиперпродукция всех трех цитокинов (IL-1 – 700-1000 пкг/мл; IFN – 780-1200 пкг/мл; IL-4 – 700 пкг/мл), а переходу в пролиферативную стадию – подавление секреции IL-4 (<20 пкг/мл) при сохранении выработки IL-1 (50-1000 пкг/мл) и/или IFN (360-750 пкг/мл). Мониторинг показал, что при умеренной продукции IL-4 (50-250 пкг/мл) прогрессирование ДР наблюдалось значительно реже (43%), чем при его гиперсекреции (100%) или дефиците (80%).

Обсуждение. Продукция IL-4 в большинстве случаев является запускаемой провоспалительными цитокинами каскадной реакцией, патогенетическое значение которой в условиях офтальмопатологии представляется неоднозначным. Ассоциация наиболее тяжелых форм (активные осложненные увеиты, пролиферативная ДР) с дефицитом IL-4, как и более благоприятное течение воспалительного или пролиферативного процесса при умеренной секреции IL-4, свидетельствуют о его протективном, антагонистическом по отношению к провоспалительным цитокинам действии. Вместе с тем, гиперсекреция IL-4 на фоне высоких уровней провоспалительных цитокинов (перед манифестацией ДР; при остром воспалении) может трактоваться двояко: как протективная компенсаторная реакция, или же как сочетанная продукция, усугубляющая патологический процесс (возможно, за счет активации гуморального иммунного ответа, усиления аллергических IgE-опосредованных реакций, снижения синтеза других цитокинов, например противовирусного IFN γ).

Заключение. Таким образом, на фоне повышенной продукции IL-1 β и/или TNF α патогенетически неблагоп-

риятными являются как дефицит, так и гиперсекреция IL-4; при умеренном повышении его уровня отрицательные эффекты провоспалительных цитокинов ослабевают. Антагонистическое действие IL-4 по отношению к IL-1 и IFN проявляется далеко не всегда и в значительной степени зависит от их количественного соотношения, в частности, от концентрации IL-4.

ОСОБЕННОСТИ ЦИТОКИНОВОЙ РЕГУЛЯЦИИ СЕКРЕЦИИ ЭНДОТЕЛИАЛЬНЫМИ КЛЕТКАМИ ХЕМОКИНА IL-8

Старикова Э.А., Фрейдлин И.С.

ГУ НИИ экспериментальной медицины РАМН, Санкт-Петербург, Россия

Активированные эндотелиальные клетки отличаются усиленной секрецией хемокинов, среди которых наиболее подробно изучен IL-8. На моноцитах ПК человека экспрессируются CXCR1 и CXCR2 – рецепторы для IL-8. В связи с этим нами была проведена оценка изменений уровня секреции IL-8 эндотелиальными клетками EA.hy926 под влиянием TNF α , IFN γ , IL-4, а также комбинаций этих цитокинов. Из всех изученных цитокинов только TNF α и его сочетания с IFN γ или с IL-4 оказывали выраженное индуцирующее действие на секрецию IL-8 клетками EA.hy926. IFN γ не обладал самостоятельным действием на секрецию IL-8, но вызывал некоторое снижение индуцирующего эффекта TNF α . IL-4 значительно слабее стимулировал секрецию IL-8 клетками EA.hy926, а в сочетании с IFN γ утрачивал этот эффект. За 48 часов инкубации эндотелиальных клеток количество секретированного IL-8 увеличивалось в 1,7 раза по сравнению с 24-часовой секрецией. Стимулирующее действие TNF α на интенсивность секреции IL-8 в этом случае было более выраженным по сравнению с 24-часовой преинкубацией (прирост количества IL-8 в 6,5 раза по сравнению с приростом в 3,6 раза). Следует отметить, что слабо выраженное стимулирующее действие IL-4 на секрецию IL-8 клетками EA.hy926 проявлялось только в случае 24-часовой преинкубации клеток с цитокином и последующей суточной инкубации после отмывки от цитокинов, а в случае 48-часовой инкубации в присутствии цитокинов IL-4 слабо ингибировал секрецию IL-8. IFN γ не оказывал самостоятельного влияния на секрецию IL-8, в сочетании с TNF α снижал выраженность его стимулирующего действия. Суммарная продукция IL-8 в условиях совместного культивирования эндотелиальных клеток EA.hy926 с клетками моноцитарной линии U937 проявилась значительно возросшим уровнем секреции (прирост количества IL-8 был в 7 раз больше, чем в случае суточной секреции эндотелиальными клетками). И в этих условиях и TNF α и IL-4 достоверно стимулировали секрецию IL-8, в том числе, и при совместном их использовании. IFN γ , напротив, достоверно ингибировал секрецию IL-8, а при совместном использовании с TNF α нивелировал его стимулирующее действие на секрецию IL-8 в культуре клеток. Среди изученных цитокинов TNF α оказывал наиболее выраженное и постоянное индуцирующее действие на секрецию IL-8 клетками EA.hy926. IFN γ не обладал самостоятельным действием на секрецию IL-8, а при сочетании с TNF α проявлял антагонистический эффект. Влияние IL-4 на секрецию IL-8 оказалось неоднозначным: после суточной преинкубации он стимулировал секрецию IL-8 в последующие 24 часа, а в случае 48-часо-

вой инкубации с цитокином он вызывал достоверную ингибицию секреции IL-8. Эффекты IFN γ не зависели от времени инкубации. Преинкубация эндотелиальных клеток с цитокинами отчетливо влияет на последующую секрецию IL-8 в культуре: TNF α , IL-4 и их сочетание достоверно стимулируют секрецию, а IFN γ достоверно ингибирует секрецию, а в сочетании с TNF α полностью нивелирует стимулирующий эффект последнего, хотя в сочетании с IL-4 IFN γ не влияет на его стимулирующий эффект. Нам удалось выявить противоположно направленное действие IFN γ и IL-4 на секрецию хемокина IL-8, причем именно провоспалительный IFN γ выступал в качестве ингибитора.

Работа поддержана грантами: РФФИ 03-04-48118, НШ-540.2003.4

ПЕПТИДЫ ИЗ ТРОФОБЛАСТИЧЕСКОГО β -ГЛОБУЛИНА ЧЕЛОВЕКА ИЗМЕНЯЮТ ЭКСПРЕССИЮ РЕЦЕПТОРА CD95L(FASL) В ЛИМФОЦИТАХ В ЗАВИСИМОСТИ ОТ ИХ ФУНКЦИОНАЛЬНОГО СОСТОЯНИЯ

Терентьев А.А., Порядин Г.В., Салмаси Ж.М.,
Александрова И.А., Тагирова А.К.,
Молдогазиева Н.Т., Макаров Т.В.,
Рябинина З.В., Казимирский А.Н.

Российский государственный медицинский университет, Москва, Россия.

Нарушение механизмов Fas-зависимого апоптоза лимфоцитов может быть обусловлено как низким уровнем экспрессии рецептора запуска активационного апоптоза CD95(Fas антиген), так и недостаточной экспрессией его лиганда – рецептора CD95L(FasL антигена). Получены данные, что нарушение пути индукции активационного апоптоза лимфоцитов ведет к замедлению элиминации аутореактивных клонов клеток и связано с патогенезом иммунопатологических заболеваний. При этом нарушение Fas-зависимого апоптоза сопровождается значительным повышением количества активированных лимфоцитов непосредственно в очаге воспаления и сопровождается снижением функциональной активности Т-лимфоцитов и их субпопуляций в связи с появлением в периферической крови дважды позитивных клеток (Т-лимфоцитов с фенотипом CD3 $^{+}$ 4 $^{+}$). (Клиническая патофизиология №1, 2004). Недостаточность активационного апоптоза лимфоцитов, обусловленная низким уровнем экспрессии рецепторов лимфоцитов CD95(Fas) и CD95L(FasL), ведет к гиперпродукции иммуноглобулинов или циркуляции аутоагрессивных клонов клеток. Получены данные о том, что солибилизация рецептора CD95L увеличивает количество цитотоксических Т-лимфоцитов в периферической крови (CD8 $^{+}$ -клетки).

Белки фетально-плацентарного комплекса альфа-фетопротейн и трофобластический бета-глобулин известны как регуляторы иммунного ответа и перспективны как источники иммунорегуляторных пептидов, способных индуцировать активационный апоптоз.

Цель настоящего исследования состояла в определении влияния четырех пептидов – продуктов ограниченного протеолиза трофобластического бета-глобулина (ТБГ) на экспрессию рецепторов индукции апоптоза лимфоцитов Fas и FasL на клеточных моделях лимфоцитов здоровых доноров и лимфоцитов человека, активированных воспалительным процессом. Лимфоциты больных иммунопатологическими заболеваниями в период обо-

стрения заболевания представляют модель клеточного пролиферативного процесса с ограниченным входом в активационный или, CD95-индуцированный апоптоз и с выраженной избыточностью TNF α опосредованного апоптоза.

Основной методический подход в работе состоял в определении экспрессии активационных антигенов лимфоцитов CD23 $^{+}$, CD25 $^{+}$, CD71 $^{+}$, HLA-DR $^{+}$, CD95 $^{+}$ и CD95L $^{+}$ с помощью метода непрямой иммунофлюоресценции с использованием моноклональных антител. Исследованию подвергали пептиды А, Е, Q и V, которые получены ограниченным протеолизом ТБГ человека и имеют молекулярную массу около 0,7 кДа. Лимфоциты культивировали в течение 16 часов с пептидами в конечной концентрации 10 $^{-8}$ М.

Исследование влияния пептидов из трофобластического бета-глобулина на экспрессию активационных антигенов лимфоцитов, полученных от 6 здоровых доноров показывает, что эти пептиды практически не вызывают дополнительной экспрессии ни одного из исследованных активационных рецепторов лимфоцитов.

Однако их влияние на лимфоциты, активированные воспалительным процессом (больные ранним ревматоидным артритом), оказывается различным. Под влиянием всех изучаемых пептидов обнаружено двукратное увеличение количества лимфоцитов, экспрессирующих рецептор запуска активационного апоптоза CD95 (Fas-антиген).

Влияние пептидов на экспрессию FasL антигена существенно различаются. Пептид V снижает в 2 раза, содержание CD95L $^{+}$ -клеток, пептид Е увеличивает этот показатель более чем в два раза, а пептиды А и Q неэффективны как модуляторы экспрессии FasL-антигена.

Таким образом, из трофобластического бета-глобулина человека выделен пептид Е, обладающий способностью увеличивать количество клеток экспрессирующих оба необходимых рецептора запуска активационного апоптоза CD95 и CD95L. Особенностью пептида является его способность модулировать экспрессию рецепторов запуска активационного апоптоза в зависимости от функционального состояния клеток мишеней. Можно предположить, что этот пептид взаимодействует с тирозинкиназными рецепторами мембран активированных лимфоцитов, вызывая экспрессию группы белков запуска активационного апоптоза, которая включает в себя также и мембранные рецепторы CD95 (Fas-антиген) и CD95L (FasL-антиген).

ПРОГНОСТИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ ДАННЫХ О БАЛАНСЕ МЕЖДУ Т-ХЕЛПЕРАМИ 1 И 2 ТИПА У ДЕТЕЙ, ЧАСТО БОЛЕЮЩИХ РЕСПИРАТОРНЫМИ ЗАБОЛЕВАНИЯМИ

Федорова И.М., Бляхер М.С., Капустин И.В.¹,
Никонова М.Ф.²

¹ТУ МНИИЭМ им. Г.Н. Габричевского, Москва, Россия; ²ГП Институт иммунологии ФУ МБ и ЭП при МЗ РФ, Москва, Россия

В ходе санаторного оздоровления 54 часто болеющих детей (ЧБД) 5-6 лет проведено их 2-кратное иммунологическое обследование с интервалом в 4 недели. За это время часть детей, несмотря на оздоровительные мероприятия, переболела ОРЗ (группа 1). Было обнаружено, что в исходных показателях их цитокинового статуса

имеются характерные отличия от показателей, наблюдаемых у детей, которые оставались здоровыми в течение всего периода наблюдения (группа 2).

Количество $CD3^+$ лимфоцитов, внутри которых методом внутриклеточной проточной цитофлуориметрии обнаруживается IL-4 ($CD3^+IL-4^+$ лимфоциты), мало отличалось в двух группах, но количество $CD3^+IFN\gamma$ -лимфоцитов, в группе 1 было достоверно ниже, чем в группе 2. Более низкие значения были характерны и для отношения $CD3^+IFN\gamma/CD3^+IL-4^+$, которое мы рассматривали как показатель баланса между Th1 и Th2 (в группе 1 Th1/Th2=6,0±1,5, в группе 2 – 10,0±3,3).

Индукцированная ФГА продукция IFN γ лейкоцитами крови колебалась от 350 до 6100 пкг/мл (средняя – 1527±702). У детей, предрасположенных к заболеванию ОРЗ, также была снижена. В группе 1 продукция IFN γ ниже 1000 пкг/мл отмечалась у 64% детей, тогда как в группе 2 таких детей было 39%.

Если величину Th1/Th2=8,0 принять в качестве критерия предрасположенности ребенка к заболеванию ОРЗ, то из детей, у которых Th1/Th2 ≤ 8,0 заболело 70%, а из детей у которых Th1/Th2 > 8,0 – только 27%.

Создается впечатление, что Th1/Th2 является одним из существенных патогенетических факторов защиты часто болеющих детей от очередного ОРЗ.

РАЗЛИЧНАЯ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ ПОПУЛЯЦИЙ $CD4^+$ Т-ЛИМФОЦИТОВ К КОНЦЕНТРАЦИИ ВНЕКЛЕТОЧНОГО $[Ca^{2+}]_0$

Хайдуков С.В., Литвинов И.С.

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

Покоящиеся наивные $CD4^+CD45RA^+$ Т-клетки чувствительны к действию иономицина, а их стимуляция приводит к повышению $[Ca^{2+}]_i$. Покоящиеся $CD4^+CD45RO^+$ Т-клетки памяти резистентны к действию иономицина, но это не препятствует осуществлению ими функций, связанных с распознаванием антигенов возбудителя и быстрого, и усиленного ответа на них *in vivo*, приводящего к эффективной защите организма от патогенов. Следовательно, при дифференцировке *in vivo* активированных Т-лимфоцитов роль Ca^{2+} постоянно меняется.

Для анализа роли $[Ca^{2+}]_0$ в активации Т-клеток использовали чувствительность этого процесса к удалению $[Ca^{2+}]_0$ с помощью EGTA. Данный методический подход обладает практически полной обратимостью вносимых изменений. Была исследована активация Т-клеток ПКЧ смесью ФМА/иономицин и их резистентной к действию иономицина фракции (ИР-фракции) в зависимости от $[Ca^{2+}]_0$ в среде, которую изменяли с помощью [EGTA]. О начальных стадиях активации судили по синтезу молекул CD69. Повышение [EGTA] в среде от 0,1 мм до 2,0 мм приводило к росту (более 20%) доли $CD4^+CD69^+$ Т-клеток в обеих популяциях с широким максимумом в интервале [EGTA] от 0,8 мм до 1,2 мм. Дальнейшее повышение [EGTA] в среде до 3,0 мм неодинаково влияло на Т-клетки и их ИР-фракцию. Возрастание [EGTA] до 3,0 мм приводило снижению более чем вдвое способности общей популяции Т-клеток к активации, однако полного подавления при данной [EGTA] никогда не наблюдалось. Напротив, доля активированных $CD4^+CD69^+$ ИР Т-клеток менялась незначительно. Неполное снижение доли активированных $CD4^+CD69^+$

Т-клеток во фракции лимфоцитов ПКЧ при [EGTA] 3,0 мм скорее всего связано с присутствием в популяции ИР Т-клеток памяти. Следовательно, даже на начальных стадиях активации ИР Т-клетки значительно меньше зависят от $[Ca^{2+}]_0$, по сравнению с их наивными предшественниками. Обсуждается изменения гомеостаза ионов кальция в Т-клетках памяти.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований, проект 03-04-48190. Авторы благодарят всех сотрудников Института биоорганической химии им. М.М. Шенякина и Ю.А. Овчинникова Российской Академии Наук, которые своей кровью помогли осуществлению представленной работы.

АКТИВАЦИЯ В ЛИМФОЦИТОВ МЫШИ Т-НЕЗАВИСИМЫМИ АНТИГЕНАМИ 2-го ТИПА

Чернышова И.Н., Гаврилова М.В., Сидорова Е.В.

ГУ НИИ вирусных препаратов РАМН, Москва, Россия

Введение. Введение антигена (АГ) индуцирует не только появление антителообразующих клеток (АОК), но и значительно повышает образование неспецифических иммуноглобулинов (НИГ), и число синтезирующих их клеток (НИГОК). Увеличение числа НИГОК под действием Т-независимых АГ 2-го типа (Th-2), не обладающих митогенной активностью, до сих пор не нашло объяснения, а роль различных В-клеточных популяций в этом процессе и механизмы, ответственные за поликлональную активацию при введении Th-2 не исследованы.

Несколько лет назад было обнаружено, что одновременное введение Т-зависимого (ТЗ) и Th-2 приводит к суммации числа индуцированных НИГОК (иНИГОК) и было высказано предположение, что каждый из этих АГ стимулирует к образованию НИГ «собственную» субпопуляцию В клеток. Позднее в опытах с Th-2 – поливинилпирролидоном (ПВП) – удалось установить, что основную роль и в специфический и в поликлональной активации В спленоцитов мыши играют клетки, несущие поверхностные Lyb5 и CD5 маркеры.

Цели и задачи исследования. Целью настоящей работы являлось выяснение вопроса о том, стимулируют ли разные Th-2 одну и ту же или разные субпопуляции В лимфоцитов. Для этого Th-2 вводили мышам порознь или в различных комбинациях и исследовали специфический и поликлональный иммунный ответ. Для сравнения использовали одновременную иммунизацию ТЗ и Th-2.

Методы исследования. BALB/c мышей иммунизировали внутривенно 50 мкг ТЗ или 2 мкг Th-2, вводимыми совместно или порознь. Селезенку удаляли на 4 сутки после иммунизации, готовили моноклеточную суспензию, и определяли число АОК и клеток, образующих тотальные иммуноглобулины (ИГОК) с помощью ELISPOT. Количество НИГОК на 10^6 спленоцитов рассчитывали по разности между количествами ИГОК и АОК; число индуцированных НИГОК (иНИГОК) рассчитывали по разности между количествами НИГОК в иммунной и нормальной суспензиях клеток.

Результаты исследования и обсуждение. Введение Th-2 (ПВП, α (1→3) декстрана, полисахарида пневмококка SIII и фикола) индуцировало появление АОК и увеличение числа иНИГОК, хотя и специфический и

поликлональные ответы при этом были ниже, чем при иммунизации ТЗ. Одновременное введение ТЗ и Th-2, как и в предыдущих опытах, вызывало появление иНИГОК в количествах, равных сумме этих клеток, появляющихся при введении каждого из АГ. В отличие от этого одновременное введение 2-х Th-2 ни в одном случае не привело к суммации числа НИГОК, индуцированных АГ. Обычно число иНИГОК при этом равнялось их количеству, образуемому под действием более «сильного» из 2-х введенных Th-2. В то же самое время одновременное введение 2-х Th-2 не нарушало образования специфических АОК, а иногда даже слегка его увеличивало. Предполагается, что различные Th-2 неспецифически стимулируют В-лимфоциты, принадлежащие к субпопуляции (-ям), размеры которой ограничены. Ограничение характерно только для «посторонних» (bystander) В-клеток. Недавно мы показали, что АОК и иНИГОК, возникающие под действием ПВП, продуцируются CD5+ В-1 клетками (Sidorova et al., 2003). Известно также, что в ответ на полисахаридные АГ бактерий (Th-2) вовлечены маргинальные В-лимфоциты селезенки. Можно предположить, что именно эти субпопуляции В-клеток участвуют и в образовании индуцируемых Th-2 иНИГОК. Механизм активации посторонних клеток Th-2 не ясен. Возможно, она обусловлена неизвестными факторами, продуцируемыми В-клетками, НК или макрофагами.

Заключение. Показано, что Th-2 вызывают не только биосинтез антител, но и образование НИГ, т.е. индуцируют не только специфический, но и поликлональный иммунный ответ.

Одновременное введение ТЗ и Th-2 приводит к суммации числа клеток, продуцирующих НИГ; одновременное введение 2-х Th-2 суммации образования иНИГОК не вызывает. Это свидетельствует о том, что ТЗ и Th-2 поликлонально активируют В-лимфоциты, принадлежащие к разным субпопуляциям В-клеток, а разные Th-2 неспецифически активируют В-лимфоциты, принадлежащие к одной и той же, ограниченной в размерах субпопуляции В-клеток.

ВЛИЯНИЕ МОНОКЛОНАЛЬНЫХ АНТИТЕЛ ПРОТИВ ТИРЕОГЛОБУЛИНА НА ТИРЕОИДНЫЙ СТАТУС ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ ЖИВОТНЫХ

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

Центральный научно-исследовательский рентгено-радиологический институт МЗ РФ, Санкт-Петербург, Россия

Одной из характеристик аутоиммунного тиреоидита – заболевания щитовидной железы (ЩЖ) является повышенное содержание аутоантител (аА) к тиреоглобулину (Тг, аАТг). Роль аАТг в индукции и течении заболевания неясна. При индукции аутоиммунного тиреоидита путем иммунизации животных Тг показана корреляция между степенью инфильтрации ЩЖ и уровнем аА, направленным к определенным фрагментам Тг. Результаты, полученные при переносе поликлональных антител (АТ) от доноров, иммунизированных Тг интактным животным, противоречивы. Использование моноклональных антител (МКАТ) против Тг позволяет с большей определенностью оценить влияние аА, направленных к отдельным эпитомам Тг, на состояние ЩЖ.

Цель настоящей работы заключалась в изучении влияния пассивного переноса МКАТ против Тг на тиреоидный статус экспериментальных животных.

Среди полученных в лаборатории МКАТ к Тг мыши было отобрано 7 реагентов с разной эпитопной специфичностью. МКАТ вводили в количестве 20 мкг на животное в полном адьюванте Фрейнда мышам линии SJL/J (возраст – 3 месяца). Через 2 недели вводили такую же дозу МКАТ в неполном адьюванте Фрейнда. Контролем служили 2 группы мышей, которым вводили МКАТ против Тг человека, не взаимодействующих с Тг мыши. На 14, 28, 42, 56 и 70 сутки после начала эксперимента от животных получали образцы крови и ЩЖ. Ткань железы фиксировали, заключали в парафин, срезы окрашивали гематоксилином и эозином и изучали структуру ткани. В сыворотке крови определяли концентрацию общего тироксина и титр аАТг. В качестве антигена при определении титра использовали Тг крысы, поскольку гомология между Тг крысы и мыши составляет более 96%.

У мышей, которым вводили МКАТ против Тг мыши и МКАТ против Тг человека, на 42 сутки содержание тироксина по сравнению с интактными животными достоверно снижалось ($p < 0,05$). В большинстве случаев этот показатель также был достоверно ниже нормы ($p < 0,05$) и на других сроках наблюдения. Титр аАТг у мышей независимо от специфичности введенных МКАТ был достоверно выше, чем у интактных животных ($p < 0,05$) в течение всего срока наблюдения, кроме 70 суток. Исключение составила одна группа животных, которым вводили одно из МКАТ против Тг мыши (1А8). При введении МКАТ, не взаимодействующих с Тг мыши, видимых патологических изменений ЩЖ отмечено не было. Начиная с 42 суток после введения МКАТ к аутоантигену, в большинстве случаев отмечали увеличение фолликулов и уплощение тиреоцитов. Только при использовании МКАТ 6С12 наблюдали нативную структуру ЩЖ. На основании полученных данных можно предположить, что пассивно перенесенные МКАТ против Тг способны влиять на структуру и функциональное состояние ЩЖ. Повышенное содержание антител против Тг в сыворотке может быть связано как с циркуляцией введенных МКАТ, так и с индукцией синтеза аАТг. В пользу второй возможности свидетельствует присутствие аАТг в сыворотке животных, получивших инъекции МКАТ против Тг человека.

ФОРМИРОВАНИЕ ГУМОРАЛЬНОГО ОТВЕТА ВНЕ ГЕРМИНАЛЬНЫХ ЦЕНТРОВ ЯВЛЯЕТСЯ ПРИЧИНОЙ ПЕРЕКЛЮЧЕНИЯ В-КЛЕТОК НА СИНТЕЗ IgE

Шевченко М.А., Шеховцова Е.Л., Свищевская Е.В.

Институт Биоорганической Химии им. акад. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва, Россия

Введение. Аллергия является результатом гиперактивации иммунной системы в ответ на низкие дозы антигенов, попадающих в организм через эпителиальные барьеры.

Целью данной работы явилось выяснения роли герминальных центров (ГЦ) в переключении В-клеток на синтез IgE.

Методы. Для формирования ГЦ мышей BALB/c иммунизировали аллергеном из грибов *A.fumigatus* Asp f 2 в полном адьюванте Фрейнда (ПАФ). Для формирования

гуморального ответа без образования ГЦ мышей иммунизировали многократно ежедневно низкими дозами Asp f 2 в фосфатном буфере (ФБ). Продукцию антител анализировали еженедельно с использованием метода твердофазного ИФА. Иммунизированные на тучных клетках IgE определяли с использованием теста на активную немедленную кожную анафилаксию у мышей. Аффинность антител определяли методом конкурентного ИФА.

Результаты. Иммунизация с ПАФ приводит к формированию высокого титра IgG, специфичного к Asp f 2 через неделю после иммунизации и отсутствию специфичного IgE на всех сроках определения. В случае иммунизации в ФБ, несмотря на повышение титров IgG, на вторую неделю после начала иммунизации, происходит формирование В-клеток, синтезирующих IgE-антитела, специфичные к Asp f 2. Используя метод активной кожной анафилаксии было показано, что кожная реакция присутствует и у мышей, иммунизированных в ПАФ, однако только в случае подкожного введения наибольшей дозы антигена, тогда как у мышей, иммунизированных в ФБ, дегрануляция наблюдалась даже при самой низкой дозе. Аффинность антител в процессе многократной иммунизации возрастала и в итоге была сопоставима с аффинностью антител, полученных в результате иммунизации в ПАФ. Аффинность специфических IgE при этом была сопоставима с аффинностью IgG, что может указывать на последовательное переключение В-клеток на синтез IgE в условиях многократной иммунизации.

Заключение. Таким образом, формирование аллерген-специфического IgE у мышей возможно только в условиях иммунизации низкими дозами в отсутствии адъюванта, т.е. без формирования герминальных центров.

АДРЕНЕРГИЧЕСКИЕ МЕХАНИЗМЫ РЕГУЛЯЦИИ ИММУННОГО ОТВЕТА И ФУНКЦИЙ НЕСПЕЦИФИЧЕСКИХ ЭФФЕКТОРНЫХ КЛЕТОК ПРИ СТРЕССЕ

Шилов Ю.И., Шилов С.Ю., Ланин Д.В.,
Гейн С.В., Орлова Е.Г., Черешнев В.А.

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

Адренергические соединения и глюкокортикоиды, являясь основными гормонами стресса, выступают как синергисты в регуляции функций иммунной системы, в частности, они оказывают однонаправленный эффект на продукцию IL-12, интерферона-гамма и ряда других цитокинов, переключают цитокиновый профиль с Th1 на Th2 тип. Однако последствия этих изменений на результирующие составляющие иммунного ответа в условиях целостного организма до конца не ясны.

Цель работы – изучение роли адренергических механизмов в регуляции иммунного ответа и функций неспецифических эффекторных клеток при различных формах стресса.

Материалы и методы. В эксперименте на крысах-самцах популяции Wistar исследовали иммуномодулирующие эффекты острого 6-часового иммобилизационного стресса и иммобилизационного стресса в сочетании с дозированной кровопотерей. Помимо этого моделировали зависимые от глюкокортикоидов и адреналина стрессорные изменения в иммунной системе введением крысам

гидрокортизона ацетата (50 мг/кг внутривенно однократно) или адреналина (1 мг/кг подкожно двукратно с интервалом 3 ч). Для блокады бета-адренорецепторов вводили пропранолола гидрохлорид (по 5 мг/кг массы тела на инъекцию с интервалом 3 ч подкожно). Показатели гуморального и клеточноопосредованного иммунного ответа оценивали в модели локального иммунного ответа, развивающегося в условиях подкожной иммунизации эритроцитами барана. Функции фагоцитирующих клеток периферической крови, органов лимфомиелоидного комплекса и брюшной полости оценивали в комплексе микротестов, включающего исследование поглотительной активности по отношению к формализированным эритроцитам барана, спектрофотометрический вариант НСТ-теста, пробы с модуляторами сигнальных внутриклеточных путей. Помимо этого проведена оценка влияния различных адренергических соединений на функции фагоцитирующих клеток интактных и стрессированных животных, а также на пролиферативный ответ лимфоцитов здоровых людей в культурах с ФГА и Кон А (учет по включению ³H-тимидина).

Основные результаты. Установлено, что блокада бета-адренорецепторов отменяла депрессивные эффекты острого стресса на реакцию гиперчувствительности замедленного типа (ГЗТ), приводила к избыточной активации функций циркулирующего пула фагоцитирующих клеток. В условиях совместного введения гидрокортизона и пропранолола, как в период индукции локального иммунного ответа, так и в его эффекторную фазу выявлена отмена супрессивного эффекта гормона на антителообразование в регионарном лимфатическом узле и выраженность реакции ГЗТ. Блокада бета-адренорецепторов нивелировала супрессивные эффекты гидрокортизона на функции перитонеальных фагоцитирующих клеток и фагоцитарную активность клеток костного мозга. Введение адреналина приводило к снижению числа антителообразующих клеток (АОК) в регионарном лимфатическом узле и выраженности ГЗТ преимущественно при его введении в эффекторную фазу (4-е сутки) иммунного ответа. Блокада бета-адренорецепторов отменяла индуцированную адреналином депрессию числа АОК, но не ГЗТ. Исследования в системе *in vitro* на пролиферативный ответ лимфоцитов здоровых людей в культурах с ФГА указывают на то, что супрессивное действие адренергических соединений на пролиферативный ответ лимфоцитов реализуется не только через бета-, но и через альфа-адренорецепторы. На основании исследований влияния адренергических соединений в системах *in vitro* и *in vivo* на фагоцитарную активность лейкоцитов и их микробицидный потенциал в НСТ-тесте можно полагать, что через бета-адренорецепторы опосредуется угнетающий, а через альфа₁- и альфа₂-адренорецепторы – стимулирующий эффект катехоламинов на эти функции фагоцитирующих клеток. В условиях стресса и введения глюкокортикоидов выявлены фазные изменения чувствительности фагоцитирующих клеток к адренергической регуляции и направленности действия на них адреналина *in vitro*, что может быть связано с регуляцией глюкокортикоидами функциональной экспрессии разных типов адренорецепторов.

Заключение. Представленные данные указывают на важную роль адренергических механизмов в регуляции функций фагоцитирующих и иммунокомпетентных клеток в условиях стресса.

КИНЕТИЧЕСКИЕ ПАРАМЕТРЫ КООПЕРАТИВНЫХ ЦИКЛИЧЕСКИХ ИЗМЕНЕНИЙ В СУБПОПУЛЯЦИЯХ ЛИМФОЦИТОВ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА ПРИ ИСКУССТВЕННОМ УВЕЛИЧЕНИИ СОДЕРЖАНИЯ ЦИРКУЛИРУЮЩИХ CD34⁺ КЛЕТОК

Шутко А.Н., *Карамуллин М.А., Екимова Л.П.,
Бочкарева Т.Н.

Центральный научно-исследовательский
рентгено-радиологический институт МЗ;
Военно-медицинская академия,
Санкт-Петербург, Россия

Ранее мы сообщали о наличии устойчивых, с периодами $T \approx 1,7$ месяца, кооперативных флюктуаций содержания субпопуляций лимфоцитов в крови у пациентов с общей патологией и онкологических больных [Shoutko A. et al, 2002; Шутко А.Н. и сотр., 2003, 2004]. Был описан также феномен увеличения в крови человека концентрации CD34⁺ клеток после однократного и многократного неинвазивного чрезкожного воздействия механических микровибраций на зоны активного кроветворения костного мозга [Шутко А.Н. и сотр., 2004; Shoutko A. et al, 2004]. В настоящей работе феномен использовали для изучения времени дифференцирования ранних субпопуляций в пределах одного периода путем сравнения данных, полученных в условиях стационарного состояния кроветворения и после пролонгированного вибрационного воздействия.

Объекты и методы: 25 ликвидаторов аварии на ЧАЭС были обследованы до и после контактного микровибрационного воздействия на кожную проекцию позвоночника со стороны спины. Микровибрации подводили через мембраны 8-ми вибраторов, соединенных с общим источником «Витафон-2», ежедневно по 10 минут в течение 2-х недель (1х5 + 1х5).

Обследование включало повторные анализы крови и субпопуляционного состава мононуклеаров крови, а также спонтанный (СС) и индуцированный ФГА синтеза ДНК (РБТ) в суммарной фракции клеток. Использовали радиометрический вариант учета синтеза с ³H-TdR β-спектрометром «Ligumet». Субпопуляции определяли с конъюгированными антителами фирм «Dako» и «BD» на флуоресцентном микроскопе «Opton» с цифровой регистрацией уровней, спектра свечения и топографической идентификацией светового и флуоресцентного изображений, получаемых в режиме SHQ.

Данные анализировали путем построения фазовых плоскостей для разных показателей, аппроксимацией кинетических кривых полиномами и синусоидой в программах Excel и «UniPlot».

Результаты. При аппроксимации данных формулой $A \cdot \sin(B \cdot x + C)$ период циклического изменения концентраций клеток различных фенотипов составил $M \pm \sigma = 1,63 \pm 0,11$ мес. = $48 \pm 3,3$ дня. Сдвиг максимумов каждой из субпопуляций оценивался в сравнении с максимумом CD34⁺ клеток, положение которого на шкале времени было принято за 0.

В стационарном режиме функционирования лимфоэза (без дополнительного вибрационного воздействия), средние сдвиги максимумов, определенные с точностью $\pm 1,5$ суток, составили: +6 суток для TdT⁺, CD8⁺11b⁺, CD8⁺ клеток и СС; +12 суток для CD19⁺ и CD2⁺35⁺ клеток; +24 суток для CD4⁺Leu8⁺, CD4⁺ клеток и РБТ.

После вибрационного воздействия на 6 суток запаздывал максимум TdT⁺ клеток, на 12 суток запаздывали

максимумы CD8⁺11b⁺, CD8⁺, CD19⁺ клеток и СС, на 18 суток запаздывал максимум CD2⁺35⁺ клеток и на 24 суток – максимумы CD4⁺Leu8⁺, CD4⁺ клеток и РБТ. Таким образом, основные изменения кооперативного поведения клеток касаются перехода TdT⁺ клеток в CD8⁺11b⁺, CD2⁺35⁺, CD19⁺ и, частично, CD4⁺Leu8⁺ субпопуляции и сводятся к замедлению примерно на 1/8 цикла.

На этом фоне воздействие приводило к достоверному увеличению CD34⁺ клеток (с $0,16 \pm 0,024$ до $0,27 \pm 0,027\%$; $t=3$), снижению отношения TdT⁺/CD34⁺ (с 182 ± 67 до 30 ± 4 ; $t=2,3$), увеличению CD8⁺11b⁺ клеток (с $13,5 \pm 1,4\%$ до $18,6 \pm 2,0\%$; $t=2,1$) и увеличению суммы CD4⁺Leu8⁺+CD8⁺11b⁺ (с $49 \pm 5,8\%$ до $64,4 \pm 2,7\%$; $t=2,4$). Увеличение отношения TdT⁺/CD34⁺ формируется не только в результате достоверного увеличения содержания CD34⁺ клеток, но и за счет сопутствующего уменьшения TdT⁺ клеток, самостоятельную достоверность которого, тем не менее, подтвердить не удается. Показатели CD2⁺, CD3⁺, CD4⁺, CD8⁺ и CD56⁺ субпопуляций, а также СС и РБТ достоверно не изменялись.

Наиболее интересные следствия: 1) переход CD34⁺ форм в TdT⁺ происходит в течение 4,5-7,5 дней; 2) спонтанный синтез ДНК ассоциирован частично с TdT⁺, но в основном с ранними CD8⁺11b⁺ клетками; 3) в реакции бласттрансформации вовлечены преимущественно клетки CD4⁺ фенотипа; 4) созревание клеток с CD8⁺ фенотипом происходит быстрее по сравнению с субпопуляцией клеток CD4⁺.

ИММУНОРНКАЗА 4D5 SCFV-ДИБАРНАЗА-HIS₅ ИЗБИРАТЕЛЬНО ТОКСИЧНА ДЛЯ КЛЕТОК ЧЕЛОВЕЧЕСКОЙ АДЕНОКАРЦИНОМЫ ЯИЧНИКА SKOV3

Эдельвейс Э.Ф., Баландин Т. Г.,
Лебедев Е.Н., Лукаш С.В., Луценко Г.В.,
Сапожников А.М., Деев С. М.

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

HER2/neu – раковоассоциированный антиген клеточной поверхности, который гиперэкспрессирован во многих человеческих карциномах, таких как рак молочной железы, легких, желудка, яичников, простаты. Гомогенное распределение в опухолевой массе и низкий уровень экспрессии в нормальной ткани позволяют рассматривать HER2/neu как оптимальную мишень для иммунодиагностики и иммунотерапии злокачественных новообразований. Сконструирован рекомбинантный белок, состоящий из одноцепочечного scFv-фрагмента анти-HER2/neu антитела 4D5 и двух молекул рибонуклеазы *Bacillus amyloliquefaciens* – барназы (4D5 scFv-дибарназа -His₅). Белок наработан в штамме-продуценте *Escherichia coli* и очищен на Ni-NTA сефарозе.

Показано, что 4D5 мини-антитело в составе рекомбинантного белка 4D5 scFv-дибарназа-His₅ способно связываться с HER2/neu антигеном. Анализ ферментативной активности методом кислоторастворимого остатка продемонстрировал, что барназа в составе этой иммуноРНКазы эффективно расщепляет РНК. Методом проточного цитометрического анализа доказано, что белок 4D5 scFv-дибарназа-His₅ специфически связывается с поверхностью HER2/neu-позитивных клеток человеческой аденокарциномы яичника SKOV3 и не связывается с HER2/neu-негативными клетками (CTLL, Hep2). С по-

мощью МТТ-теста установлено, что иммуноконъюгат 4D5 scFv-дибарназа-His₅ оказывает избирательное токсическое действие на раковые клетки, гиперэкспрессирующие HER2/neu. Белок 4D5 scFv-дибарназа-His₅ в концентрации 8 нМ вызывает снижение жизнеспособности раковых клеток SKOV3 до 50%. При такой же концентрации этот белок не оказывает токсического эффекта на клетки CTLL, не экспрессирующие HER-2/neu. Компоненты 4D5 scFv анти-HER2/neu-мини-антитело и барназа, входящие в состав иммуноРНКаза, по отдельности не токсичны как для HER-2/neu-позитивных, так и для HER-2/neu-негативных клеток в значительно более высоких концентрациях. Таким образом, сконструированный рекомбинантный белок 4D5 scFv-дибарназа-His₅ избирательно токсичен для HER2/neu-позитивных клеток человеческой аденокарциномы яичника SKOV3, что позволяет рассматривать его как новое перспективное противоопухолевое средство.

Работа поддержана программой РАН «Молекулярная и клеточная биология» и грантом РФФИ № 04-04-49024.

УЧАСТИЕ КАСПАЗ В АПОПТОЗЕ, ИНДУЦИРОВАННОМ ГАНГЛИОЗИДАМИ, CD4⁺ И CD8⁺ ПЕРИФЕРИЧЕСКИХ ЛИМФОЦИТОВ ЧЕЛОВЕКА

**Яшунская Я.Ю., Холоденко Р.В.,
Молотковская И.М.**

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

Ганглиозиды входят в состав плазматических мембран эукариотических клеток и играют важную роль в процессах их нормальной жизнедеятельности. Они функци-

онируют разнообразным образом для поддержания иммунного гомеостаза и регуляции иммунного ответа, включая клеточное узнавание, рецепцию вирусов, клеточную адгезию и контроль клеточного роста. Показано, что ганглиозиды принимают непосредственное участие в активации Т-лимфоцитов митогенами и антигенами. Они способны как усиливать, так и ослаблять интенсивность индуцированного антителами иммунного ответа. Известно, что при развитии опухолевого процесса происходит интенсивный сброс ганглиозидов с мембраны быстро делящихся опухолевых клеток. Ранее нами было показано, что ганглиозиды, добавленные в виде мицелл, индуцируют апоптоз и интерлейкин-2-зависимой клеточной линии мышей CTLL-2 (цитотоксические активированные Т-лимфоциты). Нами была поставлена задача проверить способность ганглиозидов индуцировать апоптоз различных субпопуляций Т-лимфоцитов периферических мононуклеаров крови (ПМК) человека.

Было показано, что все изученные ганглиозиды способны индуцировать апоптоз как CD4⁺CD3⁺-, так и CD8⁺CD3⁺-клеток. По своей способности к индукции цитотоксических активированных Т-лимфоцитов крови (активированных в течении 3-х суток ConA) ганглиозиды выстраиваются в ряд, аналогичный полученному для клеток линии CTLL-2, т.е. моно- и дисаилированные ганглиозиды индуцируют апоптоз сильнее, чем три- и тетрааилированные. Апоптоз, индуцированный всеми изученными ганглиозидами, является каспазозависимым. Показано, что каспаза 8 участвует в инициации каскада CD4⁺-ПМК, активированных ганглиозидами GD3, GD1b, GT1b и GQ1b, однако, каспаза 3 задействована в проведении сигнала на апоптоз для всех изученных ганглиозидов.

Работа поддержана грантом МНТЦ, проект № 2654.