

## **ОРГАНИЗАТОРЫ:**

**Министерство здравоохранения и социального развития  
Российской Федерации**

**Комитет Государственной Думы ФС РФ по науке и наукоемким технологиям**

**Северо-Западное отделение Российской академии медицинских наук**

**Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей  
и благополучия человека**

**Комитет по науке и высшей школе Правительства Санкт-Петербурга**

**Комитет по здравоохранению Правительства Санкт-Петербурга**



**НИИ экспериментальной медицины СЗО РАМН**

**НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера**

**Санкт-Петербургская государственная педиатрическая академия**

**Всероссийский центр экстренной и радиационной медицины имени А.М. Никифорова  
МЧС России**

**НИИ клинической иммунологии СО РАМН**



**Российская Ассоциация Аллергологов и Клинических Иммунологов**

**Российское научное общество иммунологов**

**Российское цитокиновое общество**

**Всероссийское научно-практическое общество эпидемиологов,  
микробиологов и паразитологов**

**Российское научное общество лабораторной диагностики**

**Научное общество по нейроиммунологии и нейроиммуномодуляции**

**Санкт-Петербургское региональное отделение Российской Ассоциации Аллергологов  
и Клинических Иммунологов**

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

## СТРУКТУРНЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ ТОЛСТОЙ КИШКИ И УРОВЕНЬ ПРОДУКЦИИ ЦИТОКИНОВ ПРИ ХОЛОДОВОМ ВОЗДЕЙСТВИИ У МЫШЕЙ BALB/C

Абдулаева С.О., Макарова О.В., Добрынина М.Т., Хомякова Т.И.

Московский государственный университет, Москва, Россия

Учреждение российской академии медицинских наук НИИ морфологии человека РАМН, Москва, Россия

**Введение.** По данным литературы стрессорное воздействие вызывает изменения функционального состояния всех интегративных систем и, в первую очередь, иммунной, а также нарушает баланс системы макроорганизм-микрофлора. Морфологические изменения толстой кишки во взаимосвязи с изменением состава микрофлоры и оценкой иммунного статуса изучены недостаточно.

Поэтому **целью работы** было изучение уровня цитокинов, морфологических изменений толстой кишки и состава ее просветной микрофлоры у мышей Balb/c.

**Материалы и методы.** Половозрелые мыши-самцы Balb/c ( $n = 60$ ) подвергались холодовой нагрузке – плавание в воде со льдом ( $t +4\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) ежедневно в течение 2-х мин. Снижение температуры в прямой кишке составило в среднем  $4,8 \pm 0,3\text{ }^{\circ}\text{C}$ , что соответствует глубокому охлаждению согласно классификации Т.В. Козыревой и Л.С. Елисейевой (2002). Мыши контрольной группы были представлены интактными животными. Исследование проводилось на 9-е, 21-е и 42-е сут холодового воздействия. Для гистологического исследования фрагмент ободочной кишки фиксировали в растворе Буэна, заключали в парафин, изготавливали гистологические препараты, окрашивали их гематоксилином и эозином, проводили ШИК-реакцию. При морфометрическом исследовании определяли глубину крипт (в мкм), относительное число бокаловидных клеток на крипту, соотношение объемной доли эпителия собственной пластинки слизистой оболочки и бокаловидных клеток. Проводили дифференцированный подсчет клеточных элементов в строме слизистой оболочки кишки, с определением относительного количества нейтрофилов, лимфоцитов и других клеточных элементов. Оценку состояния просветной микрофлоры проводили путем высева из свежеполученных фекалий, гомогенизированных в физиологическом растворе, после инкубирования в течение 40 мин по следующим параметрам (КОЕ/мг фекалий): уровень лактозоположительных и лактозоотрицательных энтеробактерий, уровень энтерококков (*E. faecalis* et *fecium*), уровень лактобактерий на соответствующих питательных средах (HiMedia, Индия). Для определения содержания кортикостерона в сыворотке крови методом ИФА использова-

ли набор Corticosterone ELISA IBL International GmbH. В культуральной жидкости спленоцитов определяли уровень 10 цитокинов методом проточной цитофлуориметрии с использованием набора mouse Th1/Th2 10plex BMS820FF BenderMedSystems на приборе CytomicsFC500 «BeckmanCoulter» США. Статистическую обработку полученных данных проводили методом вариационной статистики. Достоверность различий между показателями определяли по *t*-критерию Стьюдента и F-критерию Фишера.

**Результаты исследования.** Стрессорная реакция у мышей Balb/c на холодовое воздействие оценивалась по уровню кортикостерона. Уровень кортикостерона в сыворотке крови достоверно увеличивался на 9-е сут и оставался высоким на 21-е и 42-е сут, что свидетельствует о развитии физиологического стресса. При холодовом стрессе у мышей Balb/c не было выявлено патологических изменений в слизистой оболочке ободочной кишки, но отмечалось изменение баланса защитного слизистого барьера и микрофлоры. Реакция эпителиальной выстилки толстой кишки характеризовалась увеличением объемной доли бокаловидных клеток на 9-е сут стрессорного холодового воздействия. По данным Ф.З. Меерсона (1993), адаптационный процесс на 10-14-е сут стрессорной нагрузки характеризуется функциональным напряжением систем организма, а в более поздние сроки развивается долговременная адаптация. В разные сроки холодового воздействия по сравнению с контролем показатели глубины крипт, объемной доли стромы и клеточных элементов в собственной пластинке слизистой оболочки достоверно не изменялись. Объемная доля эпителия достоверно снижалась на 9-е сут эксперимента, а на 42-е сут показатель был выше контрольного уровня. Относительное количество нейтрофилов и лимфоцитов, а также показатель общего числа клеточных элементов в строме слизистой оболочки толстой кишки мышей Balb/c во все сроки холодового воздействия по сравнению с контролем достоверно не изменялись. Изменения микрофлоры характеризовались достоверным увеличением числа энтерококков *E. faecalis* и *E. fecium* с последующей нормализацией их количества на 42-е сут и увеличением на 42-е сут количества лактоза-ферментирующих *E. coli*, снижением уровня лактоза-неферментирующих энтеробактерий, что позволяет говорить о положительном влиянии использованного режима холодового воздействия на микробиоту кишечника. На 9-е сут стрессорного холодового воздействия достоверно снижались уровень интерлейкина (IL)-6, IL-4 в сыворотке крови. На 21-е сут холодовой нагрузки отмечали достоверное снижение IL-2, IFN $\gamma$ , GM-KCФ, IL-5 и IL-17, а также повышение уровня TNF $\alpha$  и IL-10 у мышей Balb/c. На 42-е сут эксперимента досто-

верно снижался уровень IL-2, IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$ , GM-KCФ, IL-5, IL-6, IL-17.

Таким образом, холодное воздействие в режиме плавления в воде ( $t +4^{\circ}\text{C}$ ) в течение 2-х мин ежедневно вызывает у самцов мышей Balb/c развитие адаптивных изменений, характеризующихся повышением уровня кортикостерона, увеличением объемной доли бокаловидных клеток слизистой оболочки толстой кишки, изменением количественного состава микрофлоры в сторону снижения уровня условнопатогенных и повышения количества представителей бактерий-симбионтов и снижением во все сроки эксперимента уровня цитокинов, за исключением концентрации TNF $\alpha$  и IL-10, которые на 21-е сут холодного стресса повышались.

### ИЗМЕНЕНИЕ СОДЕРЖАНИЯ ICAM-1 НА ПОВЕРХНОСТИ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК В ОТВЕТ НА ДЕЙСТВИЕ ПРОВОСПАЛИТЕЛЬНЫХ ЦИТОКИНОВ

Айзенштадт А.А.<sup>1</sup>, Могиленко Д.А.<sup>2</sup>, Климович В.Б.<sup>3</sup>

<sup>1</sup> ООО «Покровский банк стволовых клеток», Санкт-Петербург, Россия

<sup>2</sup> НИИ Экспериментальной медицины РАМН, Санкт-Петербург, Россия

<sup>3</sup> Российский научный центр радиологии и хирургических технологий, Санкт-Петербург, Россия

Мезенхимальные стволовые клетки (МСК) – резидентные клетки костного мозга, существенно влияющие на дифференцировку и пролиферацию гемопоэтических клеток. В последнее время особое внимание уделяется изучению иммуносупрессивных свойств МСК. Было показано, что МСК значительно влияют на функциональную активность Т, В, НК и дендритных клеток, причем эта система работает по принципу обратных положительных связей. Такие свойства делают МСК многообещающими кандидатами для клеточной терапии аутоиммунных заболеваний, а также РТПХ. Однако механизмы иммуносупрессивного действия МСК до конца не объяснены. В частности, не существует единого мнения, является ли прямой межклеточный контакт МСК и клеток иммунной системы необходимым для реализации иммуносупрессии или этот процесс может осуществляться через растворимые факторы. В то же время было показано, что МСК, активно экспрессирующее ICAM-1 и VCAM-1, более эффективно проявляют свои иммуносупрессивные свойства.

**Целью данной работы** было определить, влияют ли провоспалительные цитокины, в частности TNF $\alpha$  и IFN $\gamma$ , а также С3а на экспрессию ICAM-1 в мезенхимальных стволовых клетках.

МСК были получены из костного мозга при аспирации подвздошной кости донора при наличии информированного согласия. МСК культивировали до 4 пассажа в среде Advanced mesenchymal stem cell media с добавлением 10% заменителя сыворотки (HyClone, Н. Зеландия). Полученную культуру МСК с помощью проточной цитофлуориметрии проверили на наличие специфических поверхностных маркеров (CD90<sup>+</sup>, CD105<sup>+</sup>, CD34<sup>+</sup>, CD45<sup>-</sup>). Определение уровня экспрессии ICAM-1 также проводили методом проточной цитофлуориметрии, для чего культуру МСК инкубировали 1 ч в среде с соответствующим цитокином, затем снимали клетки с подложки холодным ратвором Версена (HyClone, Н. Зеландия), после чего полученную суспензию окрашивали мо-

ноклональными антителами против ICAM-1, конъюгированными с FITC (Beckman Coulter, США) в течение 20 мин. Все измерения проводили с помощью проточного цитометра FC500 (Beckman Coulter, США), анализ полученных данных проводили с помощью программного обеспечения СХР.

Нами было показано, что IFN $\gamma$  (10 нг/мл) никак не влиял на экспрессию ICAM-1, в то время как воздействие TNF $\alpha$  (10 нг/мл) приводило к существенному увеличению количества ICAM-1 на поверхности МСК. В меньшей степени, усиление экспрессия ICAM-1 происходило при воздействии С3а (10 нМ) на МСК, причем при совместном воздействии TNF $\alpha$  и С3а повышение содержания ICAM-1 носило аддитивный характер.

Чтобы выяснить, через какой сигнальный путь происходит увеличение экспрессии ICAM-1 в ответ на действие TNF $\alpha$ , перед добавлением цитокина, на клетки действовали в течение часа ингибиторами сигнальных путей, опосредованных p38 MAPK (ингибитор SB203580), NF- $\kappa$ B (QNZ), JNK 1/2/3 (SP600125) и MEK 1/2 (UO126). Ни один из вышеперечисленных ингибиторов не снижал экспрессию ICAM-1 в ответ на действие TNF $\alpha$ . Снижение уровня ICAM-1 не происходило и при действии всех четырех ингибиторов одновременно.

Таким образом, из проанализированных цитокинов наиболее сильное влияние на содержание ICAM-1 на поверхности МСК оказывал TNF $\alpha$ , причем данная реакция реализуется через сигнальные пути, отличные от p38 MAPK, NF- $\kappa$ B, JNK 1/2/3 и MEK 1/2.

### ИЗМЕНЕНИЕ МОРФОФУНКЦИОНАЛЬНОГО СОСТОЯНИЯ ТУЧНЫХ КЛЕТОК В ПРОЦЕССЕ ФОРМИРОВАНИЯ СОЕДИНИТЕЛЬНОТКАННОЙ КАПСУЛЫ ПРИ ВОСПАЛЕНИИ

Арташян О.С.

Институт иммунологии и физиологии УрО РАН, Уральский федеральный университет имени первого Президента России Б.Н. Ельцина, г. Екатеринбург, Россия

Результаты исследований реакции тучных клеток на различные экстремальные воздействия дают основание высказать гипотезу о важнейшей роли миграции мастоцитов в перераспределении клеток в организме. Удобной экспериментальной моделью для проверки этой гипотезы служит воспалительная реакция. Известно, что тучные клетки играют одну из ведущих ролей в развитии воспалительного процесса. Выброс тучными клетками медиаторов (гистамин, серотонин, триптазы, гепарин) влечет за собой изменения со стороны сосудов и системы крови, и, кроме этого, они влияют на эмиграцию иммунокомпетентных клеток к очагу воспаления.

**Цель:** изучить морфофункциональное состояние тучных клеток в процессе формирования соединительнотканной капсулы при воспалении.

**Материалы и методы.** Эксперимент проводили на 30 белых беспородных крысах. Для получения воспаления в заданном месте под кожу спины крысы вшивали стерильную полихлорвиниловую трубку, с наружным диаметром 2 мм, длиной 20 мм. Для определения динамики формирования соединительнотканной капсулы основа оставалась в организме крыс на 2, 4 и 6 недель. Гистологические срезы окрашивали гематоксилином-эозином, пикрофуксином, резорцин-фуксином; для выявления тучных клеток – основным коричневым. Плотность клеток

и межклеточных структур определяли с помощью программы «Морфология», с перерасчетом на единицу площади 1 мм<sup>2</sup>. Функциональную активность тучных клеток (степень дегрануляции) оценивали как отношение числа полностью дегранулированных клеток к общему числу анализируемых клеток, выраженное в процентах.

**Результаты.** При вшивании полихлорвиниловой основы в процессе воспаления на ней образуется соединительнотканная капсула, в которой помимо основных элементов (фибробласты, фиброциты, лимфоциты, нейтрофилы, макрофаги, коллагеновые и эластические волокна), присутствуют тучные клетки. Через 2 недели после операции стенка капсулы в основном представлена рыхлой волокнистой соединительной тканью. Преобладают пролиферирующие фибробласты (6920±70 клеток в 1 мм<sup>2</sup>), в небольшом количестве – лимфоциты, макрофаги и единичные сегментоядерные нейтрофилы. Преобладает клеточный компонент, волокнистые структуры тонкие. В большом количестве присутствуют все типы тучных клеток (437±37,02), что подтверждает факт миграции их из других тканей, поскольку они имеют низкую способность к пролиферации в периферических тканях. 4-я неделя характеризуется появлением в капсуле волокнистой соединительной ткани. Преобладают функционально-зрелые фиброциты (5320±160), которые располагаются рядами между коллагеновыми волокнами, ориентированными продольно. Встречаются тонкие эластические волокна. Определяются капилляры и тонкостенные сосуды синусоидального типа. Количество тучных клеток на этом сроке в капсуле уменьшается (254,9±22,03). В то же время увеличивается степень дегрануляции по сравнению с ранним сроком (с 18,49±3,24% по 37,26±7,39%). Через 6 недель стенка капсулы представлена волокнистой соединительной тканью. Коллагеновые волокна разной степени зрелости, которые сопровождаются тонкими эластическими волокнами. Клеточный компонент в основном представлен фиброцитами. Содержание мастоцитов возрастает и соответствует показателям 2-х недель. Степень дегрануляции остается на уровне 4-х недель.

**Выводы.** При введении подкожно стерильной трубки формируется очаг воспаления. На начальных этапах воспаления в область имплантации основы мигрируют тучные клетки, а по мере формирования соединительнотканной капсулы усиливаются процессы их дегрануляции. Пик этого процесса приходится на срок 4 недели, именно на данном этапе структура формирующейся капсулы начинает представлять собой соединительнотканное волокнистое образование. Мастоциты, вероятно, оказывают модулирующее влияние на другие клеточные элементы, принимающие участие в формировании капсулы, главным образом на фибробласты и фиброциты, а также влияют на их синтетическую способность. Представленные данные дают основание рассматривать миграцию тучных клеток в качестве одного из механизмов регуляции функций ткани.

#### ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ И ПРОТЕКТИВНАЯ АКТИВНОСТЬ ДЕНДРИТНОКЛЕТОЧНЫХ ЭКЗОСОМ

Ахматов Э.А., Хоменков В.Г., Ахматова Н.К., Курбатова Е.А., Киселевский М.В.

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

Экзосомы – мембранные везикулы эндцитозного происхождения диаметром 40-100 нм, которые высво-

бождаются множеством клеточных типов путем присоединения мультивезикулярных телец к плазматической мембране, что, по-видимому, служит транспортным средством для межклеточной коммуникации.

**Цель работы:** изучить функциональные особенности и протективную активность экзосом – дериватов дендритных клеток (ДК), генерированных из костного мозга мышей.

ДК получали из клеток костного мозга мышей СВА при культивировании с 20 нг/мл rGM-CSF и rIL-4 (Biosource, США). В качестве индукторов созревания использовали комплекс антигенов вируса гриппа H<sub>2</sub>N<sub>5</sub> (10 мкл/мл), фактора некроза опухоли (TNFα, 20 нг/мл) или Иммуновак® (25 мкг/мл) для индукции созревания ДК. Протективную активность экзосом и ДК у мышей определяли при двукратном подкожном введении с двухнедельным интервалом. Экзосомы получали из культуральной жидкости ДК (100 мл/300 млн клеток) при многоступенчатом высокоскоростном (100 000 G) центрифугировании. Осадок ресуспендировали в 5 мл PBS и по 0,5 мл вводили мышам. ДК вводили по 3-3,5 млн/мышь. Через 2 недели после последней аппликации экзосом/ДК мышей заражали интраназально вирусом гриппа H<sub>2</sub>N<sub>5</sub> (5 LD<sub>50</sub>/100 мкл). Уровень цитокинов в сыворотках мышей определяли через 4 и 8 часов после подкожного введения экзосом и ДК при помощи тест-системы FlowCytomix Mouse Th1/Th2 10 plex с использованием шариков, сенсibilизированных моноклональными антителами к цитокинам (IFNγ, IL-1β, IL-12, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-17, TNFα), производство Bender MedSystems (Австрия).

Экзосомы и ДК, из которых они получены, вне зависимости от индуктора созревания (Иммуновак® или TNFα) в комбинации с антигенами вируса гриппа H<sub>2</sub>N<sub>5</sub> защищали мышей практически в одинаковой степени (83,3-100% случаев) от вирусной инфекции при 100% гибели неиммунизированных мышей.

При однократном подкожном введении мышам экзосомы и ДК повышали уровень IFNγ (с 0 до 52±4,5% и 85±6,7%, соответственно), TNFα (с 15±1,1% до 274±21% и 311±21%), IL-12 (с 0% до 42±3,6% и 57±5,5%), IL-1β (с 115±11,4 до 304±26% и 362±25%), IL-6 (с 25±2,2% до 577±51% и 562±44%). Через 8 часов уровень данных цитокинов начинал снижаться, оставаясь при этом достаточно высоким по сравнению с интактными животными: IFNγ (73±6,5% – экзосомы и 93±5,5% – ДК), TNFα (207±15,4% и 205±15%), IL-12 (22±2,7% и 22±2,3%), IL-1β (207±14,3% и 211±16%), IL-6 (218±19% и 353±28%). IL-5 и IL-17 повышались при введении экзосом и ДК только через 8 часов (с 14,43±0,5% до 44,5±4,8% и 31,2±2,8%) и (с 0% до 24,8±3,3% и 48,5±2%) соответственно.

Активация врожденных механизмов (экспрессия цитокинов в сыворотках в ранние интервалы времени (4-8 ч) и, как предполагается, представление вирусспецифических антигенов (H<sub>2</sub>N<sub>5</sub>) в составе экзосом Т-лимфоцитам приводила к формированию адаптивного иммунитета – возникновению стойкой антигенспецифической защиты от вируса гриппа у мышей. Это означает, что экзосомы содержали антигены данного штамма вируса гриппа, которые при двукратном подкожном введении и смогли сформировать защиту у животных. В последние годы проводится множество исследований на основе экзосом, в том числе клинических. Эти испытания касаются ДК и экзосом не только при инфекционных заболеваниях, но и экзосом, секретлируемых опухолевыми клетками и ДК, что свидетельствует о перспективности их ис-

пользования для лечения и диагностики как злокачественных, так и инфекционных заболеваний.

### **ЭФФЕКТИВНОСТЬ СОЧЕТАНИЯ *IN VITRO* ФАКТОРА НЕКРОЗА ОПУХОЛИ АЛЬФА (АЛЬНОРИН) С ПРОТИВООПУХОЛЕВЫМИ ПРЕПАРАТАМИ НА КЛЕТОЧНЫХ ЛИНИЯХ МЕЛАНОМ**

**Бигвава Х.А., Черткова А.И., Заботина Т.Н., Борунова А.А., Славина Е.Г.**

*Российский Онкологический научный центр им. Н.Н. Блохина РАМН, Москва, Россия*

**Введение.** Диссеминированная меланома кожи является одной из самых злокачественных опухолей с чрезвычайно агрессивным течением и генерализацией опухолевого процесса. Накоплен значительный опыт медикаментозного лечения меланомы кожи, однако результаты терапии по-прежнему не обнадеживают. За последние годы некоторые успехи были достигнуты в лечении больных меланомой комбинацией химиотерапии и рекомбинантного TNF $\alpha$  – альнорина (Государственный научный центр «Вектор», Россия). В настоящем исследовании мы попытались прояснить некоторые проблемы относительно взаимодействия протвooпухолевых препаратов и TNF $\alpha$ .

**Цель и задачи исследования.** Целью настоящего исследования было изучение влияния альнорина на цитотоксическое действие и индукцию апоптоза протвooпухолевыми препаратами на клеточных линиях меланом.

**Материалы и методы.** В исследовании использованы 8 клеточных линий меланом, полученные из операционного материала больных. Протвooпухолевые препараты – нидран (ACNU), кармустин (BCNU) и дакарбазин (DTIC). Отечественный рекомбинантный препарат фактора некроза опухоли альфа – альнорин, в концентрациях 50 и 5 МЕ/мл. Цитотоксическую активность регистрировали с помощью МТТ-теста, а индукцию апоптоза – методом фиксированного окрашивания ДНК пропидий йодидом и методом прижизненного двойного окрашивания ДНК пропидий йодидом и аннексином V-FITC на проточном цитофлюориметре FACSCalibur (Becton Dickinson, USA).

**Результаты.** Цитотоксичность ACNU на 4-ых клеточных линиях проявлялась различно, 1 из 4 линий резистентна – mel Rac, а остальные 3 более чувствительны. Альнорин усиливает цитотоксическое действие ACNU на резистентной линии. Цитотоксическое действие BCNU исследовали на 8-ми линиях меланом: 2 линии резистентны – mel Is, mel Ibr, а другие 6 чувствительны к BCNU. Усиление цитотоксичности BCNU альнорином проявлялась в 7 из 8 клеточных линий (mel Kor, mel Ibr, mel Is, mel P, mel Rac, mel Cher, mel MTP). Из 8-ми клеточных линий исследованных к цитотоксическому действию DTIC 6 линий оказались резистентны, а 2 линии более чувствительными – mel Rac и mel P. Добавление Альнорина существенно повышало цитотоксичность DTIC в отношении клеточных линий mel MTP, mel IL. На линии mel IL при 24-часовой инкубации наблюдается индукция апоптоза BCNU, в сочетании с альнорином усиление индукции апоптоза BCNU выявлялось при низких дозах химиопрепарата. На линиях mel P и mel Rac BCNU при 24-часовой инкубации не индуцировал апоптоз, однако цитотоксическая активность на этих линиях проявлялась, а через 48 часов инкубации индукция апоптоза BCNU была хорошо выражена. Альнорин не уси-

ливал индукцию апоптоза BCNU ни через 24, ни через 48 часов. На линии mel MTP при 24-часовой инкубации наблюдается индукция апоптоза BCNU, но при комбинации с альнорином усиливается апоптоз в контроле альнорина, это единственная клеточная линия на которой TNF $\alpha$  сам по себе вызывает индукцию апоптоза. Усиление апоптоза при низкой дозе химиопрепарата это эффект альнорина. Индукция апоптоза DTIC на линии mel IL проявляется до 60% апоптотической гибели в высокой дозе препарата при 24-часовой инкубации, альнорин вызывает небольшое усиление индукции апоптоза DTIC при низкой дозе химиопрепарата. На линии mel Rac и mel Ibr при 24-часовой инкубации DTIC вызывает небольшую индукцию апоптоза, в сочетании с альнорином усиление индукции DTIC наблюдается на линии mel Ibr. На линии mel P при 24-часовой инкубации индукция апоптоза DTIC незначительна, через 48 часов наблюдается увеличение процента апоптотической гибели клеток, а через 72 часа выраженная апоптотическая гибель клеток до 93% при высокой дозе химиопрепарата. На клеточной линии mel MTP DTIC вызывает слабый апоптоз, а в сочетании с альнорином происходит индукция апоптоза, вызванная самим альнорином; DTIC блокирует в высокой дозе апоптоз, вызванный альнорином.

**Заключение.** Протвooпухолевые препараты – ACNU, BCNU, DTIC вызывают различное, но достаточно выраженное цитотоксическое действие и альнорин в большинстве случаев усиливает это действие. DTIC индуцирует заметный уровень апоптоза в клетках изученных линий, в части случаев, альнорин усиливает это действие. BCNU на разных линиях клеток индуцирует апоптоз либо через 24 часа, либо после 48 часов экспозиции. В обоих случаях альнорин не оказывает действия на индукцию апоптоза BCNU. Степень чувствительности различных линий меланом к DTIC, BCNU, ACNU не совпадает: линии чувствительные к одному препарату, могут быть резистентны к другому, и наоборот; и это оправдывает их совместное применение в лечении меланом.

### **ИЗМЕНЕНИЯ СОДЕРЖАНИЯ РАЗНЫХ ФОРМ БЕЛКОВ ТЕПЛОГО ШОКА 70 КДА В НЕЙТРОФИЛАХ ЧЕЛОВЕКА ПОД ДЕЙСТВИЕМ ТЕПЛОГО ШОКА**

**Бойко А.А., Сапожников А.М., Коваленко Е.И.**

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

Ключевая роль нейтрофилов в организме заключается в обеспечении защитных функций, осуществляемых через микроцитоз и продукцию активных форм кислорода (АФК). Однако стрессорирующие воздействия могут индуцировать в нейтрофилах избыточную продукцию АФК, оказывающих повреждающий эффект на клетку. Тепловой шок (ТШ) является стрессом, но вместе с тем индуцирует экспрессию внутриклеточных шаперонов БТШ70, имеющих большое значение в защитных механизмах клетки.

**Целью работы** явился анализ изменения содержания БТШ70 в нейтрофилах человека в ответ на ТШ и исследование внутриклеточных молекулярных механизмов функционирования этого белка в клетке.

**Материалы и методы.** Фракцию гранулоцитов выделяли путем центрифугирования цельной крови на градиенте плотности Polymorphprep (Axis-Shield). Содержание внутриклеточного БТШ70 определяли путем двойного

окрашивания моноклональными антителами к конститутивной и индуцируемой формам (BRM22, Sigma-Aldrich), к конститутивной (SPA815, Stressgen) и к индуцируемой (SPA810, Stressgen) формам белка с последующим окрашиванием вторичными F(ab')<sub>2</sub> PE-конъюгированными антителами. Клетки предварительно фиксировали и перфорировали с помощью 2% параформальдегида с содержанием тритона X-100 0,1%. Измерения проводили на проточном цитофлуориметре FACScan (Becton Dickinson).

**Основные результаты.** Выделенные нейтрофилы подвергали кратковременной тепловой обработке (43 °С, 10 мин). Как правило, сразу после ТШ цитофлуориметрическим методом регистрировалось быстрое увеличение концентрации БТШ70, окрашенных антителами BRM22 и SPA815, по сравнению с исходным уровнем, с последующим снижением уже через 15-30 мин после завершения термического воздействия. Однако методом Вестерн-блоттинга увеличения концентрации БТШ70 зарегистрировать не удалось, что может свидетельствовать в пользу того, что ТШ привел к увеличению доступности эпитопов молекулы БТШ70 для связывания с антителами внутри клетки, без увеличения экспрессии этого белка. Снижение внутриклеточного уровня БТШ70 после действия на клетки кратковременного ТШ может быть обусловлено выбросом белка во внеклеточное пространство. Большинство современных исследований посвящено феномену стресс-индуцированного экзоцитоза БТШ70 с высвобождением в окружающую среду лишь индуцируемой, а не конститутивной формы этого протеина. Однако обработка клеток глибенкламидом (0,5 мМ), ингибитором АВС-транспортёров, блокирующим секрецию внутриклеточных белков в составе эндолизосом, приводила к исчезновению фазы снижения белка спустя 15-30 мин после окончания теплового шока за счет внутриклеточной конститутивной формы.

**Заключение.** Полученные данные свидетельствуют в пользу того, что в нейтрофилах реализуется путь высвобождения конститутивной формы БТШ70 в секреторных эндолизосомах под действием ТШ.

### СОДЕРЖАНИЕ ВИТАМИНА В<sub>12</sub> В КЛЕТКАХ И МЕЖКЛЕТОЧНОЙ СРЕДЕ КОСТНОГО МОЗГА В УСЛОВИЯХ СТИМУЛЯЦИИ ГРАНУЛОЦИТОПОЗЗА

Быкова М.Ю., Юшков Б.Г.

Учреждение РАН Институт иммунологии и физиологии УрО РАН, ФГАОУ ВПО Уральский федеральный университет, г. Екатеринбург, Россия

На пролиферацию, дифференцировку и созревание каждого класса гемопоэтических клеток существенное

влияние оказывает состав межклеточной среды, в том числе содержание в ней витаминов. Однако значение этого для определения направления дифференцировки клеток изучено недостаточно.

**Цель работы:** изучить динамику витамина В<sub>12</sub> в клетках и экстрацеллюлярном матриксе костного мозга при стимуляции гранулоцитарного роста кроветворения.

**Материалы и методы.** Эксперименты выполнены на белых беспородных крысах (n = 26) массой 200-250 г, которые содержались на одинаковом стандартном рационе питания. Для стимуляции гранулоцитопоэза у животных вызывали асептическое воспаление путем введения подкожно 0,5 мл скипидара. Количественное определение витамина В<sub>12</sub> в плазме крови и межклеточном веществе костного мозга проводили через 2 и 4 суток после воздействия методом высокоэффективной жидкостной хроматографии. Для оценки значимости различий между группами использовали непараметрический критерий Манна-Уитни.

**Результаты.** Миелограмма свидетельствует о нарастающей в процессе воспаления гиперплазии гранулоцитарного роста. Что сопровождается изменением содержания витамина В<sub>12</sub> в экстрацеллюлярном матриксе (ЭЦМ) костного мозга. На вторые сутки после введения скипидара отмечается повышение содержания витамина, а на четвертые сутки его концентрация начинает понижаться, но еще превышает значение интактных крыс. В плазме крови отмечается повышение уровня витамина ко вторым суткам, а на четвертые сутки – значительное понижение (в 6 раз). В клетках костного мозга наблюдается пониженное содержание витамина В<sub>12</sub> на позднем сроке исследования. Тогда как в периферической крови на вторые сутки эксперимента обнаруживаются клетки с высоким содержанием витамина, а на четвертые сутки – наоборот, с пониженным. Следовательно, при активации гранулоцитопоэза происходит мобилизация витамина В<sub>12</sub> из депо, на что указывает повышение его концентрации в плазме крови. Увеличивается потребление витамина клетками костного мозга, что приводит к уменьшению его содержания в межклеточной среде и клетках на позднем сроке эксперимента.

**Заключение.** Данное исследование подтверждает предположение о связи пролиферативной активности костномозговых клеток с биохимическим составом межклеточной среды, тогда как направленность и избирательность эффектов требует дальнейших исследований. Наблюдаемая динамика витамина В<sub>12</sub> указывает на его необходимость в пролиферации гранулоцитарных клеток кроветворной ткани, обусловленную, очевидно, участием витамина в синтезе нуклеиновых кислот.

ТАБЛИЦА. СОДЕРЖАНИЕ ВИТАМИНА В<sub>12</sub> ПРИ ВОСПАЛЕНИИ (К ТЕЗИСАМ БЫКОВОЙ М.Ю., ЮШКОВА Г.А.)

	ЭЦМ костного мозга			Плазма крови		
	Интактные	2 сутки	4 сутки	Интактные	2 сутки	4 сутки
В <sub>12</sub> мкг/мл	66,679± 5,058	188,101± 17,271*	95,889± 7,299*#	51,725± 6,001	164,258± 21,983*	9,571± 0,420*#
	Клетки костного мозга			Клетки крови		
В <sub>12</sub> мкг/1г белка	3180,176± 356,444	3561,315± 322,749	2083,345± 202,884*#	841,825± 150,410	1667,538± 205,202*	299,466± 30,381*#

**Примечание.** \* – достоверные отличия от интактных животных (p < 0,05); # – достоверные отличия от группы Воспаление 2 сутки (p < 0,05).

**ПРОТЕКТИВНАЯ АКТИВНОСТЬ КОМПЛЕКСА АНТИГЕНОВ STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE**

Воробьев Д.С., Семенова И.Б., Курбатова Е.А.,  
Волох Ю.В., Маркова М.Е., Романенко Э.Е.,  
Батура А.П., Михайлова Н.А.

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

В настоящее время заболевания, вызванные *Streptococcus pneumoniae*, продолжают оставаться актуальной медико-социальной проблемой. По данным ВОЗ в 2005 г. от пневмококковой инфекции во всем мире погибло более 1,6 млн. человек, причем 50% из них составили дети первых 5 лет жизни. Существующие пневмококковые вакцины как на основе полисахаридных антигенов *S. pneumoniae* (Pneumo-23, Sanofi-Pasteur, Франция), так и их конъюгатов с дифтерийным анатоксином (Pnevnar, Wyeth, США) не позволяют создать защиту от всех серотипов пневмококка. Кроме того, Pneumo-23 неэффективна у детей первых 2-х лет и лиц пожилого возраста. На протяжении последних 10-15 лет активно изучаются белки *S. pneumoniae* как средство защиты от пневмококковой инфекции, так как они входят в состав практически всех штаммов этого микроорганизма. Однако представляет не меньший интерес изучение активности естественного комплекса белков и полисахаридного антигена *S. pneumoniae*.

**Целью** нашей работы было оценить протективную активность комплекса антигенов *S. pneumoniae* серотипа 3 против заражения гомологичным штаммом *S. pneumoniae*.

**Материалы и методы.** В работе был использован штамм *S. pneumoniae* № 3 тип 3, полученный из коллекции штаммов пневмококка НИИВС им. И.И. Мечникова РАМН. Культуру *S. pneumoniae* выращивали в сердечномозговом бульоне в течение 24 часов. Пневмококковый антиген выделяли путем осаждения ацетоном надосадочной фракции культуральной жидкости. По химическому составу препарат содержал 5,5% белка, 9% углеводов и 3,1% нуклеиновых кислот. Протективную активность полученного комплекса антигенов определяли в опытах активной защиты мышей.

**Результаты.** Мышей линии Balb/c иммунизировали двукратно внутрибрюшинно с интервалом 2 недели пневмококковым антигеном в дозах 10 мкг/мышь, 50 мкг/мышь и 100 мкг/мышь соответственно. Через 2 недели после последней иммунизации животных внутрибрюшинно заражали 79 LD<sub>50</sub> *S. pneumoniae* серотипом 3. Представляет интерес тот факт, что доза 10 мкг/мышь обеспечивала 90% выживаемость, а 50 мкг/мышь

и 100 мкг/мышь – 80% выживаемость мышей по сравнению с контролем, где выжило только 10% животных ( $p \leq 0,05$ ). При введении пневмококкового антигена, сорбированного на гидроксиде алюминия (24 часа при 4 °С) наблюдали 100% защиту мышей по сравнению с контролем ( $p \leq 0,05$ ). Мы выявили, что сорбированный препарат на гидроксиде алюминия был эффективен во всех трех испытанных дозах (10 мкг/мышь; 50 мкг/мышь; 100 мкг/мышь). Однако один гидроксид алюминия в эквивалентных дозах не защищал опытных животных.

Таким образом, продемонстрировано, что комплекс антигенов, выделенных из *S. pneumoniae* серотипа 3, обладает протективной активностью при заражении мышей гомологичным штаммом.

**РАЗРАБОТКА ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ СИСТЕМ ДЛЯ ОЦЕНКИ СИНТЕТИЧЕСКИХ И ПРИРОДНЫХ ЛИГАНДОВ TOLL-ПОДОБНЫХ РЕЦЕПТОРОВ**

Ганковская О.А., Лабжинов П.А., Зверев В.В.

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

Врожденный иммунитет является первой линией защиты от патогенов. К настоящему времени достаточно хорошо изучены Toll-подобные рецепторы (TLR), в меньшей степени RIG-подобные рецепторы, которые являются наиболее важными представителями семейства PRR. Эндосомальные TLRs (TLR3, TLR7, TLR8, TLR9) и RIG-1 распознают различные мотивы нуклеотидных последовательностей и обеспечивающие противовирусную защиту. В последние годы активно синтезируются и выделяются природные лиганды PRR, которые используются для разработки новых иммуномодуляторов, вакцин, адъювантов и др. К наиболее изученным агонистам PRR относятся poly I:C (лиганд TLR3), UC-1V150 (лиганд TLR7), неметелированные участки CpG ДНК (лиганд TLR9), Иквимод (лиганд TLR7, 8), Изатарбин (лиганд TLR7, 8), одноцепочечные, двуцепочечные- РНК вирусов и т.д.

**Целью настоящего исследования** являлась разработка экспериментальных подходов для оценки иммунологической активности лигандов PRR (синтетических и природных).

**Материалы.** В работе были использованы нуклеотидные последовательности (Синтол, РФ) и штаммы ВПГ-1 (VR-3) и ВПГ-2 (MS), полученные из Национальной вирусной коллекции (Великобритания). Эксперименты *in vitro* проводились на культуре клеток почек зеле-

**ТАБЛИЦА. ХАРАКТЕРИСТИКА ЛИГАНДОВ TLRs (К ТЕЗИСАМ ГАНКОВСКОЙ О.А. И ДР.)**

TLR	Наименование лиганда	Последовательность	Природа лиганда
TLR3	Poly(I:C)		синтетический
TLR7/ TLR8	RNA_lig_1	uuu-uuu-uuu-uuu-uuu-uu	синтетический
	RNA_lig_2	ccg-agg-aug-cga-ggc-uug-uu	синтетический
	RNA_lig_3	gcc-aug-gug-ucu-agg-gcc-cg	синтетический
TLR9	CpG_h (Немеет.CpG человека)	tcg-tcg-ttt-tgt-cgt-tgt-cgt	синтетический
	Tpol1(послед.полимеразы ВПГ-1)	cag-cgc-cat-acg-tac-tat-agc-g	синтетический
	TK-A (послед.тимидинкин. ВПГ-1)	ata-ccg-acg-ata-tgc-gac-ct	синтетический
	HSVIF(послед. gH)	gcg-ccg-tca-gcg-agg-ata-ac	синтетический
	ДНК ВПГ-1		природный

ных мартышек – *Vero* (Институт им. Пастера, г. Санкт-Петербург) и культуре эпителиальных клеток цервикального канала – *HeLa* (ГУ НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Н.Ф. Гамалеи, РАМН). Для модели *in vivo* были взяты мыши линии BALB/C самцы, весом 18–19 г. Все животные были получены из питомника «Андреевка» ГУ НЦБМТ РАМН (Москва, РФ).

**Результаты и обсуждение.** На первом этапе были подобраны последовательности синтетических лигандов, которые представлены в таблице. Все представленные лиганды проверялись на цитотоксическое действие в культурах клеток (*Vero*, *HeLa*). Нами было показано, что даже в максимальной концентрации препаратов (20 мкг/мл) препараты не обладали цитотоксическим эффектом. На следующем этапе работы в моделях *in vivo* была исследована динамика экспрессии TLRs белыми клетками крови при действии нетоксичных доз природных и синтетических лигандов TLR3, 7, 8, 9. В качестве группы сравнения использовалась группа мышей, которым вводили ЛПС (лиганд TLR4).

**Заключение.** На основании новых данных о действии лигандов PRR на уровне экспрессии генов TLRs и на продукцию цитокинов в культуре эпителиальных клеток *in vitro*, а также в моделях *in vivo*, планируется создать методический подход, позволяющий провести оценку иммунологической активности лигандов TLRs.

#### К ВОПРОСУ О МЕХАНИЗМАХ АНТИГЕННОЙ АКТИВНОСТИ МИНЕРАЛОВ

Голохваст К.С.<sup>1,2</sup>, Паничев А.М.<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Дальневосточный федеральный университет, г. Владивосток, Россия

<sup>2</sup> Владивостокский филиал ДНЦ физиологии и патологии дыхания СО РАМН – НИИ медицинской климатологии и восстановительного лечения, г. Владивосток, Россия

<sup>3</sup> Тихоокеанский институт географии ДВО РАН, г. Владивосток, Россия

Долгое время вопрос о том, являются ли частицы минералов антигенами, остается открытым. Для исследования механизмов ответной реакции иммунной системы на частицы минералов было изучено влияние цеолита Лютогского месторождения на продукцию цитокинов *in vitro* по стандартному методу Де Грута с соавторами (De Groote et al., 1992). Концентрацию цитокинов измеряли методом твердофазного иммуноферментного анализа с использованием коммерческих тест-систем «Протеиновый контур» (IFN $\gamma$ , IL-10) и «Цитокин» (IL-1 $\beta$ ). Нами обнаружено, что частицы минералов атмосферных взвесей вызывают иммунный отклик *in vitro* в дозировках 5 и 50 мг/мл, выявляющиеся в усилении спонтанной индукции IFN $\gamma$  в 1,6 раза, а также IL-1 $\beta$  и IL-10 в 2 раза. Минералы атмосферных взвесей (на примере цеолитов Лютогского месторождения) при митогенстимулированной индукции (фитогемагглютинин) изменяют продукцию цитокинов и проявляют дозозависимый эффект, что проявляется в снижении концентрации провоспалительного IL-1 $\beta$  в 1,5 раза (5 мг/мл) и практически в 4 раза (50 мг/мл), а также в повышении содержания IFN $\gamma$  в 3 раза (5 мг/мл) и 2,5 раза (50 мг/мл) и IL-10 в 2,4 раза (5 мг/мл) и 1,5 раза (50 мг/мл).

Таким образом, при дозе 5 мг/мл (аналог слабого «запыления») при митогенстимулированной индукции про-

дукции цитокинов наблюдается яркая иммунная реакция, проявляющаяся в интенсивном росте IFN $\gamma$  и менее выраженном росте IL-1 $\beta$  и IL-10. Когда же модельная величина «запыления» достигает 50 мг/мл, концентрация провоспалительного IL-1 $\beta$  падает в 4 раза по сравнению с контролем. Это говорит о том, что организм позвоночных животных имеет механизм адаптации к повышению запыленности. Пусковым «курком» этого механизма является иммунная система, позволяющая интенсифицировать ответ на более высокий уровень запыленности.

Рабочая гипотеза о том, что на поверхности минералов могут быть сорбированы части бактериальной или иной ДНК, при исследовании взятых в эксперимент цеолитов методом полимеразной цепной реакции, не подтвердилась.

Считается, что при хроническом производственном пылевом воздействии возникает окислительный стресс, обуславливающий развитие воспалительно-деструктивных и аутоиммунных процессов в респираторной системе. При этом очевидно, что ответная реакция иммунной системы при многолетнем воздействии пыли и при кратковременном влиянии частиц минералов на иммунные клетки *in vitro* будут иметь разные механизмы. Сам процесс перекисного окисления липидов (ПОЛ) является древней сигнальной внутриклеточной системой, которая настроена на распознавание физико-химических процессов с участием свободных радикалов (например, влияние радиации на организм).

Известно, что микрочастицы некоторых минералов (например, кварц) при попадании в живой организм являются источником свободных радикалов, что, скорее всего, является следствием механического повреждения мембраны клеток. Хотя сам процесс такого «повреждения» также заслуживает отдельной дискуссии. Скорее всего, речь идет не о механическом повреждении клеток, а о физико-химическом контакте мембраны клетки с поверхностью минералов, через ПОЛ как сигнальную систему, и в зависимости от типа и свойств физико-химических минералов проявляется в разных ответных реакциях – от нейтральной до канцерогенной (например, реакция на асбест и эрионит).

#### ВЛИЯНИЕ ИММУНИЗАЦИИ ПОЛИВИНИЛПИРРОЛИДОМ НА ЧИСЛЕННОСТЬ СТРОМАЛЬНЫХ КЛЕТОК-ПРЕДШЕСТВЕННИКОВ КОСТНОГО МОЗГА И СЕЛЕЗЕНКИ И ЭКСПРЕССИЮ ГЕНОВ ЦИТОКИНОВ В ПЕРВИЧНЫХ КУЛЬТУРАХ ЭТИХ КЛЕТОК У МЫШЕЙ СВА И СВА/Н

Горская Ю.Ф., Данилова Т.А., Мезенцева М.В., Шаповал И.М., Нестеренко В.Г.

НИИЭМ им. Н.Ф. Гамалеи Минздравсоцразвития, Москва, Россия

Известно, что стромальные клетки обеспечивают в организме микроокружение для пролиферации и дифференцировки гемопоэтических и лимфоидных клеток. Ранее нами было показано, что введение мышам СВА микробной массы *S. typhimurium* уже через сутки увеличивает эффективность клонирования (ЭКО-Ф) и содержание стромальных клеток-предшественников (КОК-Ф) в костном мозге в 5 раз и селезенке в 8 раз. Кроме того, в первичных культурах клеток костного мозга и селезенки от иммунизированных животных уже через сутки появлялась экспрессия генов провоспалительных цитокинов IL- $\beta$ , IL-6, IL-8 и TNF $\alpha$ , которая сохранялась не менее

3-х суток (костный мозг) и 6-15 суток (селезенка) после иммунизации. В данной работе изучено влияние иммунизации поливинилпирролидоном (ПВП) (вызывающий слабый иммунный ответ синтетический Т-независимый антиген 2 типа) на ЭКО-Ф и численность КОК-Ф костного мозга и селезенки мышей СВА и СВА/Н. О количестве стромальных клеток-предшественников в эксплантируемых взвесах судили по числу колоний стромальных фибробластов, которые они образуют в монослойных культурах *in vitro*. Определение активности мРНК цитокинов в клетках культур проводили с использованием методов ОТ-ПЦР. Показано, что при введении ПВП мышам СВА наблюдалось только двукратное повышение численности этих величин как в костном мозге, так и в селезенке с максимумом на 1 сутки.

В первичных культурах костного мозга, взятого от иммунизированных ПВП мышей СВА, появление экспрессии генов провоспалительных цитокинов IL-6 и TNF $\alpha$  было отмечено только на 1 сутки. Таким образом, степень активации стромальной ткани при иммунизации ПВП была значительно ниже по сравнению с иммунизацией антигенами *S. typhimurium*. У мышей СВА/Н, не отвечающих на ПВП вследствие отсутствия CD5<sup>+</sup>V1a клеток в результате *xid* мутации, не наблюдалось ни повышения ЭКО-Ф, ни увеличения численности КОК-Ф в указанных органах. Полученные данные свидетельствуют о том, что степень активации стромальной ткани при иммунизации мышей коррелирует со степенью выраженности иммунного ответа, что указывает на тесную связь между стромальной тканью и иммунной системой, а также на возможность позитивного участия стромальных клеток в реализации иммунного ответа в организме.

## РАЗРАБОТКА НОВЫХ ПОДХОДОВ К ЦЕЛЕВОЙ ДОСТАВКЕ МАКРОФАГОВ В ОРГАНИЗМЕ МЫШИ

Гришина Л.В., Перминова Е.И., Щепотина Е.Г., Пашкина Е.А., Майбородин И.В., Якушенко Е.В., Козлов В.А.

НИИ клинической иммунологии СО РАМН, г. Новосибирск, Россия

Для клеточных технологий одной из проблем является нецелесообразное воздействие клеток. Доставка клеток непосредственно в патологический очаг – орган или ткань организма – значительно повысит эффективность клеточной терапии. Использование магнитных наночастиц для адресной доставки клеток в очаг повреждения является одним из решений данной проблемы. В литературе описывается возможность управления распределением наночастиц оксида железа, в организме крысы с помощью наружного магнитного поля. Однако, подобные исследования пока единичны и требуют дальнейшей разработки данного направления.

**Цель** нашего исследования – разработать метод целевой доставки макрофагов, нагруженных наноразмерными частицами суперпарамагнитного магнетита (Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>) с помощью локального магнитного поля и исследовать безопасность используемых наночастиц Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>.

**Материалы и методы.** В работе использовали наноразмерный суперпарамагнитный магнетит (Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>), полученный механохимическим способом в Томском научном центре СО РАН. Исследование проводилось на мышах (СВА × С57Bl/6)F1, самцах. Животные на протяжении эксперимента содержались в условиях, соответствующих требованиям. Разработана методика фиксации локального магнитного поля в организме мыши – магнит округлой формы вшивается в мышцу или подкожно в бедро животного. Перитониальные макрофаги, извлеченные из мыши, культивируются *in vitro* с частицами суперпарамагнитного магнетита (Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>), затем макрофаги, насыщенные частицами Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> вводятся внутривенно в хвостовую вену мыши и устремляются к магнитному источнику. Идентифицировали наличие железа в гистологическом материале с помощью окраски по Перлсу. Исследовались группы мышей как со вшитым магнитом, так и без

**ТАБЛИЦА. ЭКО-Ф В КУЛЬТУРАХ КЛЕТОК КОСТНОГО МОЗГА И СЕЛЕЗЕНКИ МЫШЕЙ, ИММУНИЗИРОВАННЫХ ПВП (M±m) (К ТЕЗИСАМ ГОРСКОЙ Ю.Ф. И ДР.)**

Линия мышей	Орган	Срок после иммунизации (сут.)	Число ядерных клеток на орган (× 10 <sup>7</sup> )	ЭКО-Ф (× 10 <sup>5</sup> )	Число КОК-Ф на орган
СВА	Костный мозг	Контроль (интактные)	1,1±0,2	1,4±0,2	161±22
		1	1,0±0,2	3,0±0,4	300±60
		3	1,0±0,2	1,4±0,1	140±28
	Селезенка	Контроль (интактные)	14,5±2,1	0,10±0,02	140±16
		1	12,4±0,3	0,21±0,03	260±63
		3	11,9±1,0	0,17±0,03	205±35
СВА/Н	Костный мозг	Контроль (интактные)	0,8±0,2	5,5±0,2	440±110
		1	0,8±0,2	7,1±0,4	568±132
		3	1,0±0,2	5,5±0,1	550±110
	Селезенка	Контроль (интактные)	8,8±1,0	0,08±0,02	69±7
		1	8,0±0,4	0,08±0,01	65±2
		3	9,0±1,2	0,08±0,01	72±8

него, но с введенными внутривенно макрофагами, насыщенными  $Fe_3O_4$ . Количество форменных элементов периферической крови мыши определяли с помощью гематологического анализатора ERMA PC190 (Япония) на 1-е, 4-е и 6-е сутки после введения.

**Результаты.** Гистологическое исследование показало, что введенный внутривенно  $Fe_3O_4$  накапливается в основном в печени и селезенке, в небольших количествах наблюдается в легких, отсутствует в миокарде и почках. Патологических изменений во внутренних органах через 15 суток после введения обнаружено не было. Исследование через 14 месяцев после введения  $Fe_3O_4$  показало отсутствие ионов железа в печени, легких, почках, селезенке. В отношении прооперированных животных показано, что в мышце на месте локализации магнита наблюдается скопление очагов железа, а также что  $Fe_3O_4$  накапливается в основном в печени и селезенке, в небольших количествах наблюдается в легких, отсутствует в миокарде и почках. В группе с магнитом наблюдали меньшее количество железа во всех органах, по сравнению с группами без магнита. Следовательно, в данной группе большая часть парамагнитных частиц аккумулируется у источника магнитного поля. При внутривенном введении суспензии в среде RPMI-1640 в дозе 10 мг  $Fe_3O_4$ /кг самцам мышей (C57BL/6 × CBA)F1 видимых признаков токсичности исследуемого соединения выявлено не было. Поведение, состояние волосяного покрова и слизистых оболочек, потребление корма и воды оставались без видимых изменений. Различия в количестве форменных элементов крови, таких как лейкоциты, тромбоциты и уровне гемоглобина не были статистически значимыми. Достоверное различие наблюдалось только на 6-е сутки в отношении эритроцитов – контроль  $11,915 \pm 0,45$  и  $Fe_3O_4$   $11,135 \pm 0,43 \times 10^6$  клеток/мкл. Показано, что инкубирование с  $Fe_3O_4$  перитонеальных макрофагов мыши не оказывает влияния на их жизнеспособность ( $98,5 \pm 0,71\%$ ).

**Заключение.** Таким образом, на основании полученных нами данных, можно сделать вывод, что использование наноразмерного суперпарамагнитного магнетита и локального магнитного поля для адресной доставки макрофагов и визуализации трафика клеток, применяемых при клеточной терапии, является целесообразным и перспективным. Показана безопасность используемого соединения  $Fe_3O_4$  для организма мыши *in vivo* и клеток *in vitro*. В этом направлении будут проводиться дальнейшие исследования.

#### МЕМБРАНА ЭРИТРОЦИТОВ И ИММУННАЯ РЕАКТИВНОСТЬ В УСЛОВИЯХ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО ОСТРОГО ПАНКРЕАТИТА

Долгарева С.А., Локтионов А.Л., Азарова Ю.Э., Конопля А.И., Гаврилюк В.П.

Курский государственный медицинский университет, г. Курск, Россия

**Введение.** Эритроциты вовлекаются в патологический процесс не только при гематологических заболеваниях, но и претерпевают серьезные изменения структуры и функции при болезнях разного генеза. При стрессе и в условиях патологии развивается метаболическая иммуносупрессия, обусловленная нарушением структуры клеточных мембран и индукцией иммуносупрессирующих свойств у эритроцитов. При этом недостаточно изученным остается роль красных клеток крови в патогенезе

заболеваний хирургического профиля, в частности, при остром панкреатите.

**Цель и задачи.** Установление взаимосвязи между изменениями в мембране эритроцитов и иммунной реактивности у животных в условиях экспериментального острого панкреатита.

**Материалы и методы.** Исследования проведены на крысах Вистар массой 180–200 г. В опытах использовали животных, прошедших карантинный режим вивария Курского государственного медицинского университета и не имевших внешних признаков каких-либо заболеваний. Все животные содержались в одинаковых условиях, на обычном пищевом режиме. Для получения статистически достоверных результатов группы формировали из 15–17 животных. Экспериментальный острый панкреатит (ЭОП) моделировали по R.N. Wang (1995) в модификации С.А. Алехина (2006).

**Основные результаты.** Установлено, что введение эритроцитов, полученных на 2-е сутки после воспроизведения ЭОП, приводило к возникновению у аллогенных здоровых доноров иммуносупрессии на эритроциты бариана. Еще большей ингибирующей активностью обладали эритроциты, полученные на 3-и и 5-е сутки после воспроизведения острого панкреатита. Эритроциты интактных крыс, обработанные сывороткой аллогенных доноров с экспериментальным острым панкреатитом на 3-и (и еще больше на 5-е) сутки после воспроизведения, при введении здоровым аллогенным донорам также приводили к развитию иммуносупрессии. Эритроциты интактных крыс, обработанные плазмой, обогащенной тромбоцитами аллогенных доноров с острым панкреатитом, полученной на 3-и (и еще более на 5-е) сутки после воспроизведения, при введении в организм здоровым животным вызывали снижение количества антителиобразующих клеток, что не наблюдается при обработке плазмой, дефицитной тромбоцитами.

Появление иммуносупрессирующих свойств у эритроцитов коррелирует с изменениями белкового спектра в их мембране. Так, начиная со 2-х суток от моделирования, в сыворотке крови выявлены повышение концентрации ацилгидроперекисей и малонового диальдегида, которое достигает максимальных значений к пятым суткам, и снижение активности каталазы. На 5-е сутки наблюдаются изменения количественной представленности белков в мембране, сохраняющиеся и на 7, 9 и 12 сутки: увеличение количества анионтранспортного белка (или белка полосы 3),  $\beta$ -спектрина и белка полосы 4.5 и уменьшение содержания глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы.

Увеличение представленности  $\beta$ -спектрина стимулирует полимеризацию спектрина, который «прошивает» эритроцитарную мембрану, делая ее прочнее и стабильнее, но менее эластичной и упругой. Повышение количества анионтранспортного белка увеличивает скорость транспортировки углекислого газа из тканей в легкие. Увеличение белка полосы 4.5, участвующего в транспорте глюкозы и аминокислот в клетку, стимулирует пластический и энергетический обмен в эритроцитах. Снижение содержания белка полосы 6 (глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы), участвующего в формировании 2-3-бифосфоглицератного шунта, свидетельствует о старении эритроцитов.

**Заключение.** Таким образом, в условиях наблюдаемого окислительного стресса происходят нарушения структуры клеточных мембран, накопление в сосудистом русле измененных продуктов метаболизма, которые, фиксиру-

ясь на мембране эритроцитов, изменяя их архитектуру, доставляются в лимфоидные органы и взаимодействуют с иммунокомпетентными клетками, активируя выделение иммунорегуляторных цитокинов.

### УЧАСТИЕ TLR4, CD14 И CD11b РЕЦЕПТОРОВ В ФАГОЦИТОЗЕ БАКТЕРИЙ НЕЙТРОФИЛАМИ ЧЕЛОВЕКА ПРИ ПРАЙМИРОВАНИИ ЛИПОПОЛИСАХАРИДАМИ РАЗЛИЧНОЙ СТРУКТУРЫ

Зубова С.В., Косякова Н.И., Грачев С.В., Прохоренко И.Р.

Институт фундаментальных проблем биологии РАН,  
г. Пушкино, Московская обл., Россия  
Отделение аллергологии и иммунологии ПНЦ РАН,  
г. Пушкино, Московская обл., Россия

**Введение.** Фагоцитоз является важнейшей функцией нейтрофилов. На фагоцитарную активность клеток влияет праймирование, вызываемое эндотоксинами (липополисахаридами). В процесс праймирования вовлекаются разные рецепторы, в том числе TLR4, CD14, CD11b, которые могут вносить свой вклад в фагоцитоз в зависимости от состава липополисахарида.

**Цель и задачи.** Целью работы явилось исследование роли TLR4, CD14 и CD11b в фагоцитозе бактерий нейтрофилами человека, праймированными липополисахаридами различной структуры. В связи с этим была исследована способность нейтрофилов в присутствии моноклональных АТ, специфичных к этим рецепторам, поглощать ФИТЦ-меченые бактерии *E. coli*. Эксперименты проводили на цельной крови, обеспечивая тем самым присутствие всех значимых участников процесса фагоцитоза — белков компонента, иммуноглобулинов и других, приближая исследуемый процесс к условиям *in vivo*.

**Материалы и методы.** Исследование выполнено на крови 5 условно здоровых доноров 25-35 лет. В пробирку вносили 90 мкл цельной гепаринизированной крови и 50 мкл суспензии ФИТЦ-меченых бактерий *E. coli* ( $2 \times 10^7$  кл/мл, соотношение лейкоциты: бактерии — 1:10), тщательно перемешивали и инкубировали 30 мин при 37 °С. Эритроциты лизировали при комнатной температуре 5 мин. Лейкоциты осаждали центрифугированием (21 °С, 200 g, 5 мин), отмывали охлажденным PBS, содержащим 0,02% ЭДТА, осадок ресуспендировали в 400 мкл ПБС-ЭДТА. Анализ образцов проводили на цитофлуориметре EPICS XL-MCL (Beckman Coulter). Фагоцитарную активность нейтрофилов оценивали по средней величине интенсивности флуоресценции.

В экспериментах по исследованию влияния активации клеток эндотоксинами на фагоцитоз перед добавлением ФИТЦ-меченых бактерий *E. coli* в кровь вносили по 100 нг/мл различных ЛПС (из *E. coli* S-, *E. coli* Re или *Rb. capsulatus*) и инкубировали 30 мин при 37 °С.

В серии экспериментов по исследованию роли TLR4, CD14 и CD11b в фагоцитозе перед постановкой реакции кровь инкубировали 30 мин с 1 мкг АТ. В экспериментах по исследованию участия рецепторов в фагоцитозе бактерий нейтрофилами, праймированными эндотоксинами, после инкубации клеток с соответствующими АТ в кровь добавляли по 100 нг/мл различных ЛПС и инкубировали 30 мин при 37 °С, а затем бактерии.

**Основные результаты.** Праймирование клеток токсичными Re- или S-ЛПС из *E. coli* усиливала фагоцитоз в среднем на 14%. В аналогичных условиях эксперимента, преактивация нейтрофилов ЛПС из *Rb. capsulatus* прак-

тически не влияла на уровень фагоцитоза. Собственно АТ, использованных в работе клонов, к TLR4 или к CD14 обладают небольшим стимулирующим действием на неспецифическую фагоцитирующую активность нейтрофилов (3% и 6% соответственно), тогда как АТ к CD11b подавляют фагоцитоз на 7%. Предварительная обработка клеток АТ к каждому из исследуемых рецепторов подавляла фагоцитоз бактерий праймированными нейтрофилами. Особенно заметное подавление наблюдается для CD11b при праймировании ЛПС из *E. coli* S-хемотипа.

**Заключение.** Фагоцитарная активность нейтрофилов возрастает при праймировании клеток эндотоксинами из *E. coli*; хемотип ЛПС практически не влияет на наблюдаемый эффект. Нетоксичный ЛПС из *Rb. capsulatus* не влияет на фагоцитирующую активность нейтрофилов. Полученные данные свидетельствуют о том, что в цельной крови TLR4 и CD14 не играют ключевой роли в обеспечении активности фагоцитоза бактерий непраймированными нейтрофилами. Эти рецепторы участвуют в регуляции фагоцитоза при праймировании клеток эндотоксинами.

Вклад CD11b в фагоцитозе бактерий нейтрофилами наблюдается для как для непраймированных, так и праймированных эндотоксинами клеток.

### ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ СТАФИЛОКОККОВЫХ АНТИГЕННЫХ ПРЕПАРАТОВ С TOLL-ПОДОБНЫМИ РЕЦЕПТОРАМИ

Игнатова О.М., Грубер И.М., Ахматова Н.К.

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

Toll-подобные рецепторы (TLR) имеются на мембранах макрофагов, нейтрофилов, дендритных клеток (ДК), В-лимфоцитов и участвуют в распознавании патоген-ассоциированных микробных структур, расположенных на поверхности микробных клеток. TLR индуцируют созревание макрофагов и ДК, а также экспрессию ими костимулирующих молекул типа CD80/CD86, которые способствуют презентации микробных пептидов Т-лимфоцитам.

**Цель работы:** определение способности антигенных препаратов, выделенных из вакцинных штаммов *Staphylococcus aureus*, взаимодействовать с toll-подобными рецепторами TLR2 и TLR4, а также выступать в роли индукторов созревания ДК.

**Методы:** штаммы *S. aureus* № 5, 9, 1986 и 1991 выращивали в различных питательных средах и условиях культивирования (на полноценных плотной и в жидкой среде в условиях реакторного культивирования, в том числе в полусинтетической среде). Взаимодействие с TLR изучали на линии клеток эмбриональной почки человека 293, стабильно экспрессирующей hTLR4/MD2-CD2-CD14 и hTLR2/CD14 и несущей ген  $\beta$ -галактозидазы под контролем NF- $\kappa$ B-зависимого промотора. Влияние антигенных препаратов на созревание ДК, полученных из клеток костного мозга (ККМ) мышей и мононуклеарных лейкоцитов периферической крови (МЛПК) доноров определяли при их культивировании с изучаемыми препаратами.

В результате исследования отмечено взаимодействие препаратов с TLR2 что обусловлено наличием лигандов, входящих в их состав, и отсутствие взаимодействия с TLR4, поскольку в препаратах не содержится ЛПС, что зафиксировано в присутствии положительных контролей (синтетического липопептида и ЛПС из *E. coli*). По-

казано, что антигенные препараты, являясь индуктором созревания ДК, генерированных как из ККМ мышей, так и из МЛПК доноров, увеличивали численность клеток, экспрессирующих TLR2, в то время как классический индуктор созревания (TNF $\alpha$ ) не повышал численность клеток с данным рецептором. При этом препараты, полученные из культур с плотной среды повышали численность клеток, экспрессирующих TLR2 относительно ДК без индуктора созревания, соответственно, в 3,2 и 8,5 раз и из реакторного культивирования – в 2,4 и 4,5 раза, соответственно. Таким образом, стафилококковые антигенные препараты способны как индуцировать созревание клеток, экспрессирующих TLR2, так и взаимодействовать с ним на модели линии клеток эмбриональной почки человека.

### ЭФФЕКТЫ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ НЕЙТРОФИЛОВ КРОВИ ЗДОРОВЫХ ДОНОРОВ С КРИОГЛОБУЛИНАМИ

Истомина Т.Ю., Хомякова Н.Ф.,  
Константинова Н.А., Константинова Е.В.

ГОУ ВПО РГМУ Росздрава, Москва, Россия

**Введение.** Криоглобулинемия характеризуется присутствием в крови криоглобулинов (КГ) – белков с аномальной растворимостью, зависящей от температуры. Для многих нозологий показано, что присутствие КГ в крови больных является предиктором негативного исхода заболевания. В организме КГ образуют криокомплексы (КК), которые в дальнейшем элиминируются путем фагоцитоза. Однако при ряде заболеваний КК мелкого и среднего размера длительно персистируют в кровотоке, что обуславливает их высокую патогенность.

**Цель:** исследование взаимодействие сывороточных криоглобулинов с нейтрофилами здоровых доноров.

**Материалы и методы.** Использовалась кровь здоровых доноров ( $n = 15$ ). Для оценки фагоцитарной функции нейтрофилов использовался метод люминол-зависимой хемилюминесценции (ХЛ). Измерения производились на автоматизированной системе «Люцифер-Б». Определялся максимальный поток ХЛ. В качестве стимула использовался неопсонизированный зимозан. Предварительно клетки инкубировались либо с растворенными КГ, либо с КК. Растворенные КГ получали выдерживанием в течение 30 мин при 37 °С, КК – при 18 °С. КГ получали от больных с инфарктом миокарда и ишемическим инсультом. Концентрация сывороточных КГ, выделенных по методу А.Е. Kalovidoris, в модификациях, определялась на спектрофотометре «Cary 50 Bio» (США) при 4 °С и 37 °С.

**Основные результаты.** Введение в суспензию клеток растворенных КГ не влияло на уровень спонтанной ХЛ нейтрофилов. В то время как, при добавлении КК наблюдалась вспышка ХЛ. Предварительная инкубация с растворенными КГ приводила к снижению последующего ХЛ-ответа нейтрофилов на НЗ более чем в 1,5 раза, даже несмотря на незначительные концентрации КГ (10% от сывороточной). Подавление ХЛ-ответа было обусловлено опсонизацией зимозана растворенными КГ. Таким образом, растворенные КГ могут препятствовать процессам клеточного фагоцитоза, что приводит к нарушению элиминации мелких и средних КК. ХЛ-ответ нейтрофилов на НЗ после взаимодействия с КК увеличивался более чем в 2,5 раза. Это указывает на участие КК в кондиционировании нейтрофилов и приводит к общей сенсibilизации фагоцитарного звена иммунитета.

**Заключение.** ХЛ-ответ нейтрофилов определяется зависящей от температуры конформацией КГ. Инкубация суспензии клеток с растворенными КГ снижает их ХЛ-ответ на НЗ. В то время как инкубация с КК, которые сами являются объектом фагоцитоза, приводит к праймингу нейтрофилов.

### ВЛИЯНИЕ МИКРООРГАНИЗМОВ ИЗ ВЕЧНОЙ МЕРЗЛОТЫ НА ДИФФЕРЕНЦИРОВКУ КЛЕТОК В КОСТНОМ МОЗГЕ

Каленова Л.Ф., Суховой Ю.Г., Брушков А.В.,  
Новикова М.А., Беседин И.М., Костоломова Е.Г.

Тюменский научный центр СО РАН, г. Тюмень, Россия

**Введение.** В вечной мерзлоте Якутии возрастом 3,5-2 миллиона (Brouchkov A. and Williams P., 2002) обнаружен новый вид микроорганизмов *Bacillus sp.* (МО), у которого нуклеотидная последовательность 16S rRNA была депонирована в DDBJ/EMBL/GeneBank под номером AB178889. Результаты биологического тестирования показали, что МО способны оказывать системное влияние на организм лабораторных животных – изменять функциональную активность иммунной системы, поведение, пищевую инстинкт, мышечную силу, двигательную активность и продолжительность их жизни (Каленова Л.Ф. с соавт., 2008; 2010; 2011).

**Цель** данного исследования – изучить влияние МО *Bacillus sp.* на дифференцировку клеток в костном мозге в эксперименте на лабораторных мышах.

**Материалы и методы.** Исследование проведено на 32 лабораторных мышах массой 18-20 г. МО ввели однократно 16 животным внутрибрюшинно в дозе  $5 \times 10^3$  микробных тел (м. т.) в 100 мкл физиологического раствора. Контрольным животным ( $n = 16$ ) ввели физиологический раствор. Костный мозг выделяли из бедренной кости на 21 сутки после введения МО. Активность дифференцировки гемопоэтических клеток оценивали методами дифференцированного подсчета клеток в миелограмме и прямой иммунофлюоресценции с использованием моноклональных антител CD117, CD34, CD25, CD44 и TCR $\alpha\beta$  (Becton Dickinson Biociences, USA) на проточном цитофлуориметре FACSCalibur (Becton Dickinson, USA). Результаты обрабатывали в программе CellQuest. Достоверность различий между группами оценивали по  $t$  критерию Стьюдента в программе «SPSS 11,5 for Windows».

**Основные результаты.** Данные миелограммы показывают, что под влиянием МО отмечается достоверное уменьшение доли недифференцированных бластов ( $p < 0,01$ ), миелобластов ( $p < 0,01$ ) и сегментоядерных нейтрофилов ( $p < 0,01$ ) на фоне повышения уровня лимфоцитов ( $p < 0,01$ ) среди всей популяции гемопоэтических клеток в костном мозге. Эти данные свидетельствуют о модулирующем влиянии малых доз МО на пролиферативную активность ранних предшественников гемопоэза и дифференцировку клеток миелоцитарного и лимфоцитарного ростков кроветворения в костном мозге со сдвигом баланса в сторону лимфопоэза. Исследование иммунофенотипа клеток костного мозга показало, что под влиянием МО отмечается снижение экспрессии CD34<sup>+</sup>CD117<sup>+</sup> ( $2,72 \pm 0,16\%$ ,  $p < 0,05$  относительно  $3,69 \pm 0,47\%$  в контроле) и CD34<sup>+</sup>CD117<sup>-</sup> ( $5,17 \pm 0,75\%$  против  $7,81 \pm 1,15\%$  в контроле,  $p < 0,05$ ) на фоне увеличения доли CD34<sup>+</sup>CD117<sup>+</sup> клеток ( $41,52 \pm 1,19\%$  против  $14,09 \pm 1,14\%$ ,  $p < 0,01$ ). К клеткам, экспрессирующим рецепторы CD117 для ФСК и CD34 молекулы адгезии

к строме костного мозга, относится значительная часть ГСК, пул лимфоидных стволовых клеток (ЛСК) и ранние предшественники В-лимфоцитов (про-В, пре-В1 и пре-В2), которые могут пролиферировать и дифференцироваться, в том числе под влиянием ФСК. Снижен уровень «оседлых» CD25<sup>+</sup>CD44<sup>-</sup> лимфоцитов (21,96±0,95% против 45,71±1,65%,  $p < 0,01$ ) и увеличена доля CD25<sup>+</sup>CD44<sup>+</sup> лимфоцитов, способных к циркуляции (37,5±8,4% против 17,13±0,58%,  $p < 0,01$ ) на фоне снижения уровня CD44<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> клеток (13,95±0,77% против 19,63±2,1%,  $p < 0,01$ ). В их число могут входить ЛСК, незрелые В-лимфоциты, заканчивающие стадию антигеннезависимой дифференцировки в костном мозге. Увеличение доли CD25<sup>+</sup>CD44<sup>+</sup> лимфоцитов сочетается с общим увеличением численности лимфоцитов в костном мозге. Отмечено достоверное снижение уровня лимфоцитов с экспрессией TCR $\alpha\beta$  (3,69±0,24% против 5,18±0,18%,  $p < 0,01$ ). Данный факт может свидетельствовать о том, что под влиянием малых доз РМО снижается регуляторная функция Т-лимфоцитов в костном мозге.

**Заключение.** Таким образом, проведенное исследование показало, что реликтовые МО из вечной мерзлоты в малых дозах ( $5 \times 10^3$  м. т.) способны оказывать модулирующее влияние на дифференцировку клеток в костном мозге. Под влиянием МО увеличивается доля ранних предшественников гемопоэтических клеток и уровень лимфоидных предшественников. В основе этого может лежать изменение спектра секретируемых резидентными стромальными клетками брюшной полости и перитонеальными макрофагами (согласно месту введения микроорганизмов) цитокинов и регуляторной функции Т-лимфоцитов. Проведенные нами исследования свидетельствуют, что МО как непосредственные участники многотысячелетнего эксперимента по адаптации к существованию в экстремальных условиях среды приобрели некоторые свойства повышенной жизнестойкости, которые они способны передать другим видам живых существ.

### СТРЕСС И КОНФОРМАЦИЯ МОЛЕКУЛЫ АЛЬБУМИНА СЫВОРОТКИ КРОВИ У АКТИВНЫХ И ПАССИВНЫХ КРЫС ПРИ ИЗМЕНЕНИИ ИММУННОГО СТАТУСА

Калинина Е.Н., Коплик Е.В., Перцов С.С., Калиниченко Л.С.

НИИ нормальной физиологии им. П.К. Анохина РАМН, Москва, Россия

Психоэмоциональный стресс возникает в условиях конфликтных ситуаций и сопровождается неврозами, эндокринными и иммунными нарушениями, изменениями состава крови и др. (Судаков К.В., 1981). Изменение содержания биологически активных веществ и метаболитов в организме при патологических состояниях, в частности при стрессорных нагрузках, во многом связано с нарушением транспортной функции крови.

Обеспечивая транспортную функцию крови, альбумин является переносчиком гормонов, метаболитов, жирных кислот и др. Это свойство белка обеспечивается наличием связывающих центров, взаимодействующих с лигандами (Peters T. J., 1996). Патологические состояния зачастую характеризуются постоянной общей концентрацией сывороточного альбумина, но изменениями конформации его молекулы (Добрецов Г.Е. с соавт., 2009).

При исследованиях альбумина измеряют как общую (массовую) концентрацию альбумина в сыворотке крови, так и его эффективную концентрацию. Эффективная

концентрация отражает количество свободных для связывания с лигандом центров молекулы. Соотношение эффективной и общей концентрации альбумина характеризует связывающую способность молекулы (Добрецов Г.Е. с соавт., 2009). Несмотря на большое количество работ по исследованию конформации альбумина при различных патологиях, особенности молекулы белка при стрессорных воздействиях практически не изучены.

Стресс сопровождается изменениями соотношения про- и противовоспалительных цитокинов (Кетлинский С.А., Симбирцев А.С., 2008). Провоспалительный цитокин интерлейкин-1 $\beta$  индуцирует каскад секреции других цитокинов в организме, оказывает влияние на гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковый комплекс (Gadek-Michalska A. et al., 2008). Особенностью противовоспалительного интерлейкина-4 является его влияние как на клеточные, так и на гуморальные иммунные процессы (Кетлинский С.А., Симбирцев А.С., 2008).

**Целью работы** было изучение влияния цитокинов с разнонаправленными свойствами – интерлейкина-1 $\beta$  и интерлейкина-4 – на альбуминовые показатели сыворотки крови у крыс с разными поведенческими характеристиками при стрессорной нагрузке.

Опыты выполнены на 52 крысах самцах Вистар, характеризующихся высокой и низкой активностью в тесте «открытое поле». Животные с указанными типами поведения являются соответственно прогностически устойчивыми и предрасположенными к негативным последствиям эмоционального стресса (Коплик Е.В., 2002). Интерлейкин-4, интерлейкин-1 $\beta$  (5 мкг/кг) или физиологический раствор вводили животным внутривенно за 1 час до стрессорной нагрузки. Нестрессированные животные получали указанные инъекции за 2 часа до депривации. В качестве модели острого эмоционального стресса использовали 1-ч иммобилизацию крыс с одновременным электрокожным раздражением подпороговой силы в стохастическом режиме. Альбуминовые показатели сыворотки крови определяли флуоресцентным методом с применением зонда К-35.

Введение интерлейкина-1 $\beta$  и интерлейкина-4 вызвало снижение общей и эффективной концентрации сывороточного альбумина у нестрессированных крыс с разными параметрами поведения. В этих условиях отмечено увеличение связывающей способности альбумина крови. Вероятно, после введения интерлейкина-1 $\beta$  и интерлейкина-4 наблюдалось перераспределение альбумина из крови в ткани. Повышение связывающей способности на фоне инъекции цитокинов, по-видимому, связано с изменениями конформации белка. При этом наблюдается «раскрытие» его молекулы и увеличение числа мест связывания. Указанный эффект выявлен у активных, но не у пассивных крыс.

Острый эмоциональный стресс сопровождался снижением общей концентрации альбумина в сыворотке крови пассивных крыс, но не оказывал значимого влияния на связывающую способность белка у этих животных.

Предварительное введение интерлейкина-1 $\beta$  и интерлейкина-4 нивелировало изменения, выявленные у пассивных крыс после стресса. У активных животных в этих условиях, напротив, отмечено снижение общей и эффективной концентраций альбумина, по сравнению с особями, подвергнутых стрессорной нагрузке на фоне введения физиологического раствора. Однако связывающая способность альбумина у этих животных повышалась.

Таким образом, интерлейкин-1 $\beta$  и интерлейкин-4 оказывают модулирующее влияние как на содержание альбумина в сыворотке крови крыс, так и на его связывающую способность. Более выраженные эффекты интерлейкина-1 $\beta$  и интерлейкина-4 у активных крыс по сравнению с пассивными особями могут быть обусловлены особенностями метаболических процессов у животных с разной поведенческой активностью.

### **ПРОТИВОВОСПАЛИТЕЛЬНЫЙ ЦИТОКИН ИНТЕРЛЕЙКИН-4 КАК МОДУЛЯТОР ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ ПЕРИФЕРИЧЕСКОГО ОТДЕЛА ГИПОТАЛАМО-ГИПОФИЗАРНО-НАДПОЧЕЧНИКОВОГО КОМПЛЕКСА У КРЫС С РАЗНЫМИ ХАРАКТЕРИСТИКАМИ ПОВЕДЕНИЯ**

**Калиниченко Л.С., Перцов С.С., Коплик Е.В.**

*НИИ нормальной физиологии им. П.К. Анохина РАМН, Москва, Россия*

Одним из ключевых механизмов развития эмоционального стресса у млекопитающих является активация гипоталамо-гипофизарно-надпочечникового комплекса. К периферическим проявлениям этого процесса относятся, в частности, фазовые колебания продукции кортикостерона корой надпочечников и его концентрации в сыворотке крови (Schneiderman N. et al., 2005). Описанная в составе триады биологического стресса (Selye H., 1946) гипертрофия коркового слоя надпочечников, продуцирующих кортикостерон, также является следствием стрессорных нагрузок.

Развитие стрессорного ответа сопровождается нарушением иммунных функций. Описаны изменения цитокинового профиля биологических сред у млекопитающих, подвергнутых стрессорным нагрузкам (Перцов С.С. с соавт., 2009). Цитокины, являющиеся медиаторами межклеточных взаимодействий, регулируют целый ряд процессов в условиях нормы и патологии (Кетлинский С.А., Симбирцев А.С., 2008). В исследованиях *in vitro* показано, что противовоспалительный цитокин интерлейкин-4 может снижать активность гипоталамо-гипофизарно-надпочечникового комплекса (Woods A., Judd A., 2008).

В ранних исследованиях эмоционального стресса обнаружены выраженные различия устойчивости млекопитающих к негативным последствиям эмоционального стресса. Выявлено, что активные в тесте «открытое поле» крысы прогностически более устойчивы к стрессорным воздействиям по сравнению с пассивными особями (Коплик Е.В., 2002).

**Целью работы** явилось изучение влияния интерлейкина-4 на содержание кортикостерона в сыворотке крови, а также состояние надпочечников у крыс с разной устойчивостью к эмоциональному стрессу.

Опыты проведены на 34 крысах-самцах Вистар с активным и пассивным типами поведения в открытом поле. За 1 ч до стрессорной нагрузки животным вводили ПЛ-4 (5 мкг/кг, в/б) или физиологический раствор. Нестрессированные особи получали инъекции за 2 часа до декапитации. Моделью острого эмоционального стресса служила 1-ч иммобилизация крыс с одновременным электрокожным раздражением подпороговой силы в стохастическом режиме. Стрессированных и интактных животных декапитировали после окончания опытов, извлекали и взвешивали надпочечники. Концентрацию кортикосте-

рона в сыворотке крови крыс измеряли с помощью иммуноферментного анализа.

Острый эмоциональный стресс сопровождался значительным увеличением концентрации кортикостерона и уменьшением относительной массы надпочечников у крыс.

Введение интерлейкина-4 вызывало снижение уровня кортикостерона в крови интактных активных крыс. Масса надпочечников на фоне инъекции этого иммуномодулятора снижалась у пассивных, но не у активных животных.

Стрессорная нагрузка на фоне введения интерлейкина-4 не оказывала значимого влияния на уровень кортикостерона в сыворотке крови и относительную массу надпочечников у крыс с разными поведенческими характеристиками, по сравнению с нестрессированными крысами. Указанные параметры на фоне введения интерлейкина-4 не отличались от таковых у стрессированных животных, получавших инъекции физиологического раствора.

Таким образом, в обычных условиях противовоспалительный цитокин интерлейкин-4 оказывает модулирующее влияние на содержание кортикостерона в крови и состояние надпочечников у интактных крыс. Выявленные эффекты цитокина различались у животных с разными параметрами поведения. В отличие от результатов исследований, проведенных *in vitro*, в нашей работе показано, что интерлейкин-4 не изменял функциональную активность гипоталамо-гипофизарно-надпочечникового комплекса у животных при острой стрессорной нагрузке.

### **ОСОБЕННОСТИ ФОРМИРОВАНИЯ РЕГУЛЯТОРНЫХ ДЕНДРИТНЫХ КЛЕТОК *IN VITRO* У МЫШЕЙ С РАЗЛИЧНОЙ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬЮ К ТУБЕРКУЛЕЗУ**

**Капина М.А., Рубакова Э.И., Апт А.С.**

*Центральный институт туберкулеза РАМН, Москва, Россия*

Известно, что зрелые дендритные клетки (ДК) являются антиген презентующими клетками, тогда как незрелые ДК могут угнетать Т-клеточный иммунный ответ; их называют регуляторными ДК (ДКрег). В настоящей работе исследовали развитие ДКрег из костномозговых предшественников в культуре при контакте со стромой легких мышей двух инбредных линий с оппозитной чувствительностью к туберкулезу (ТБ): С57В1/6 – резистентные мыши, I/St – высоко чувствительные мыши.

Для оценки влияния инфекционного процесса на свойства стромы легкого проводили сравнение ДКрег выращенных на строме, полученной от интактных и зараженных микобактериями животных. Фенотип ДКрег характеризовали с использованием проточной цитометрии, а также определяли продукцию цитокинов этими клетками. Функциональную активность ДКрег оценивали в пролиферативном тесте с использованием Т-клеточных линий, специфичных к антигенам микобактерий.

Ранние костномозговые предшественники (Lin<sup>-</sup> клетки) получали от интактных мышей обогащением на магнитной колонке с “Lineage depletion kit” (Myltenyi Biotech). Lin<sup>-</sup> клетки наносили на клетки сингенной стромы легкого и культивировали в течение 7 дней. В соответствии с литературными данными к популяции ДКрег относили неприлипающие клетки с фенотипом CD11b<sup>high</sup>, CD11c<sup>low</sup>, MHC 2 class<sup>low</sup>. Супрессорную активность ДКрег оценивали после их добавления к сингенным клет-

кам Т-линии CD4<sup>+</sup> в присутствии антигенпрезентирующих клеток и микобактериальных антигенов.

Было показано, что добавление ДКрег, выращенных на легочной строме мышей, к пролиферирующим Т-клеткам приводит к угнетению этого ответа и эффект зависит от дозы ДКрег. ДКрег вырабатывают супрессорные цитокины IL-10, TGF-β и простагландин E. ДКрег, полученные на зараженной строме резистентных животных, вырабатывали IL-10 и TGF-β больше, чем аналогичные клетки, выращенные на строме чувствительных мышей.

ДКрег, индуцированные на строме легкого как незараженных, так и зараженных резистентных мышей, супрессировали пролиферативный ответ Т-клеток значительно сильнее, чем аналогичные ДКрег чувствительной линии.

Это согласуется с полученными ранее в нашей лаборатории данными (Eguslanov и соавт., 2004), свидетельствующими о том, что у чувствительных I/St мышей при туберкулезной инфекции наблюдается необычайно высокий пролиферативный ответ Т-лимфоцитов, приводящий к нарушению функции легкого. Избыточный Т-клеточный ответ, приводящий к усилению патологии в легких у чувствительных к ТБ мышей, возможно развивается вследствие сниженной способности образовывать супрессорные регуляторные клетки.

#### ЭФФЕКТЫ АУТОАНТИТЕЛ К TNFα В ТЕСТАХ *IN VITRO*

Киреев Ф.Д., Лопатникова Ю.А., Голикова Е.А., Сенников С.В.

НИИ Клинической иммунологии СО РАМН,  
г. Новосибирск, Россия

Естественные аутоантитела к цитокинам в организме могут выполнять ряд биологических функций, таких как нейтрализация биологических эффектов цитокинов, регуляция их активности, депонирование цитокинов и увеличение длительности их существования.

**Цель:** изучить биологическую активность естественных аутоантител к TNFα, выделенных из сыворотки крови условно здоровых доноров.

**Материалы и методы.** Для выделения аутоантител (ААТ) использовалась сыворотка периферической крови условно-здоровых доноров. Все процедуры по получению ААТ проводились с помощью хроматографической системы Bio-Logic LP System и сорбентов: Bio Gel P 6 DG (Bio Rad), Protein G Sepharose 4 Fast Flow (GE Healthcare), Affi-Gel 15 (Bio Rad). Определение биологической активности проводили на 48-часовой культуре мононуклеарных клеток периферической крови (МНК ПК) условно-здоровых доноров, выделенных стандартным методом на градиенте плотности фиколла-урографина, с оценкой содержания в кондиционной среде IFNγ, IL-1β, IL-6 методами ИФА (Вектор-Бест). Оценка нейтрализующего эффекта TNFα проводилась на клеточной линии мышинных фибробластов L929 с помощью реактива МТТ.

**Результаты.** При изучении биологической активности аутоантител было показано их специфическое действие в нескольких тестах: по отмене цитотоксического действия TNFα на клеточную мышиную линию L929, а также по влиянию на продукцию иммунорегуляторных цитокинов в культуре мононуклеарных клеток человека. В экспериментах на линии мышинных фибробластов L929 было показано, что сами аутоантитела не оказывают какого либо цитотоксического эффекта на данные клетки,

а при соинкубации с TNFα был отмечен дозозависимый (1-100 нг/мл) нейтрализующий эффект цитотоксического действия TNFα. В культуре МНК ПК человека были показаны костимулирующие эффекты TNFα и аутоантител к TNFα на продукцию иммунорегуляторных цитокинов, таких как IL-1β, IFNγ, IL-6. Биологические эффекты аутоантител были обнаружены при предварительной соинкубации с TNFα: 0,5 нг/мл TNFα, 50 нг/мл IgG аутоантител к TNFα в течении 3 часов при 37 °С. Для IL-1β, IL-6 и IFNγ отмечено достоверное увеличение продукции при добавлении в культуру МНК комплекса аутоантител и TNFα по сравнению со спонтанной культурой и стимулированной TNFα. Самостоятельных эффектов TNFα в культуре МНК человека не обнаружено.

Таким образом, показано, что ААТ к иммунорегуляторному цитокину TNFα принимают участие в регуляции активности медиатора, усиливая его биологические эффекты, и, соответственно, могут влиять и на формирование иммунного ответа. Работа поддержана грантом ФЦП «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» на 2009-2013 гг (Госконтракт П1305 от 09.06.2010) и РФФИ (08-04-00576-а).

#### ОСОБЕННОСТИ МОРФОЛОГИЧЕСКОЙ СТРУКТУРЫ ЛИМФАТИЧЕСКИХ УЗЛОВ КРОЛИКОВ ПРИ ИМПЛАНТАЦИИ ПОРИСТОГО ТИТАНА С УГЛЕРОДСОДЕРЖАЩИМ НАНОПОКРЫТИЕМ И ВНЕДРЕННЫМИ В ПОРЫ ЧАСТИЦАМИ ГИДРОКСИАПАТИТА

Киселева Н.С.<sup>1,2</sup>, Макарова Э.Б.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> ФГУ Уральский НИИ травматологии и ортопедии им. В.Д. Чаклина, г. Екатеринбург, Россия

<sup>2</sup> ГОУ ВПО Уральская государственная медицинская академия Минздрава России, г. Екатеринбург, Россия

Проблема замещения утраченной в результате травмы или патологического процесса костной ткани по-прежнему актуальна. Одно из возможных ее решений — использование пористых материалов, которые обладают механической прочностью и способны интегрироваться с костным ложем. Для повышения биосовместимости пористого титана в институте физики металлов УрО РАН разработаны оригинальные методики нанесения углеродсодержащих алмазоподобных покрытий толщиной ≈ 20 нм. В поры части имплантатов был введен потенциальный остеоиндуктор — гидроксиапатит. Критерием биоинертности имплантата является реакция иммунной системы, проявляющаяся, в том числе и изменением клеточного состава и структуры лимфатических узлов.

**Цель исследования** — изучить особенности морфологической структуры лимфатических узлов в ответ на внедрение биоимплантатов на основе пористого титана с композитным нанопокрывтием или с нанопокрывтием и внедренным гидроксиапатитом.

**Материалы и методы.** 11 половозрелым кроликам под наркозом вводили импланты в мышелки большеберцовой и бедренных костей. Предварительно их насыщали аутологичными прилипающими клетками костного мозга. Количество клеток увеличивали культивированием в полной культуральной среде в течение 14 суток. Пяти животным 1 группы установлены имплантаты из пористого титана (ПТ), покрытые алмазоподобным покрытием, трем кроликам 2 группы — ПТ, покрытые углеродсодержащим покрытием, а в поры внедрены части-

цы гидроксиапатита ( $\text{Ca}_{10}\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$  (ГА). Группа сравнения – интактные животные. Через 1 и 4 месяца после операции животных выводили из эксперимента и проводили исследование регионарных и контралатеральных лимфатических узлов. В гистологических срезах 5-6 мкм, окрашенных гематоксилин-эозином, изучали соотношения площадей, занимаемых структурными элементами лимфатических узлов, определяли среднюю численность клеток в поле зрения и их процентное соотношение (лимфоаденограмма). Площадь поля зрения составила 0,025 мм<sup>2</sup>. Морфометрические исследования осуществляли при помощи аппаратно-программного комплекса ВидеоТесТ-Мастер «Морфология» 4.0. Для выявления различий между группами по количественному признаку применяли непараметрический критерий Манна-Уитни. Статистические гипотезы считали подтвержденными при уровне значимости  $p \leq 0,05$ .

**Результаты исследования.** Гистологическое и морфометрическое исследование регионарных и контралатеральных лимфатических узлов кроликов через месяц после операции выявило существенные различия между исследуемыми группами. Так, у кроликов 1 группы в регионарных и контралатеральных лимфатических узлах отмечаются умеренно выраженные изменения реактивного характера, преимущественно в паракортикальной зоне.

У животных с внедренными имплантатами, содержащими ГА, по сравнению с группой без ГА лимфоидная гиперплазия в лимфоузлах носит смешанный характер, т.е. изменения выявляются во всех зонах органа. Выражен отек коры лимфоузла с достоверным в 1,5 раза увеличением площади паракортикальной зоны и снижением численной плотности клеток в ней в 1,2 раза. Кроме того, у животных 2 группы обнаружено более значимое нарастание количества макрофагов, плазмочитов и бластных клеток – в Т-зависимой зоне лимфоузла – в 5,3 раза, в В-зависимой зоне – в 2 раза, что указывает на более значительную активацию иммунной системы у животных с внедренными имплантатами, содержащими гидроксиапатит, по сравнению с 1 группой. В контралатеральных лимфоузлах у животных 2 группы обращает на себя внимание эозинофилия в мозговом веществе, вероятно, так или иначе связанная с сенсibilизацией организма.

Через 4 месяца после операции, описанные выше тенденции, сохраняются. Однако происходит значимое снижение (на 25,7%) численности лимфоцитов в корковом плато и паракортикальной зоне (на 35,4%) у животных с композитными имплантатами.

Кроме того, количество лимфобластов в корковом плато и паракортикальной зоне у животных с ГА в порах имплантата начинает уменьшаться и разница между группой с композитным покрытием и группой с ГА по этому показателю нивелируется и приближается к значениям в группе интактных животных, хотя и не достигает референсных значений. В герминативной зоне и в мозговом веществе количество лимфобластов снижается до референсных величин.

Таким образом, на внедрение имплантатов у животных обеих групп происходит активизация клеточных и гуморальных механизмов иммунитета. В группе животных с внедренными имплантатами с нанопокрывением и с гидроксиапатитом – ответ иммунной системы более выражен и, вероятно, носит генерализованный характер.

## МIF И ПОЛИПРЕНИЛФОСФАТ НАТРИЯ РАЗНОНАПРАВЛЕННО ВОЗДЕЙСТВУЮТ НА ТЕЧЕНИЕ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИИ У МЫШЕЙ

Коженикова Т.Н.<sup>1</sup>, Суслов А.П.<sup>1</sup>, Третьяков О.Ю.<sup>1</sup>, Саличев А.В.<sup>2</sup>, Санина В.Ю.<sup>1</sup>, Смирнова Е.Г.<sup>1</sup>, Ожерелков С.В.<sup>2</sup>, Санин А.В.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> ФГБУ НИИЭМ им. Н.Ф. Гамалеи

Минздравсоцразвития РФ, Москва, Россия

<sup>2</sup> ИПВЭ им. М.П. Чумакова РАМН, Москва, Россия

**Введение.** Фактор, ингибирующий миграцию макрофагов (MIF), является одним из ключевых провоспалительных медиаторов, играющих важную регуляторную роль при инфекционной патологии. В последнее время значительно возрос интерес к роли MIF при вирусных инфекциях, особенно – при инфекциях, вызванных флавивирусами (лихорадка Западного Нила, Денге и др.). Получены данные, свидетельствующие о том, что высокие уровни MIF в сыворотках крови больных могут являться показателями тяжести течения вирусных инфекций, играющих важную роль в инфекционной патологии человека.

В предыдущих исследованиях мы показали, что MIF, вводимый мышам внутривентриально (в/б) одновременно с вирусом клещевого энцефалита (ВКЭ) в дозе 100 ЛД<sub>50</sub>, способен вызывать утяжеление инфекции. Было также показано, что полипренилфосфат натрия (ППФ), обладающий терапевтическим эффектом при флавивирусных инфекциях (Ожерелков С.В. и др., 2000) подавляет вирусиндуцированную продукцию MIF в клетках P388D1 через 24 часа после их заражения ВКЭ, проявляя активность контр-MIF.

В настоящей работе изучали влияние MIF при интрацеребральном (и/ц) способе введения на течение экспериментальной инфекции, вызванной у мышей ВКЭ в низкой дозе – 1 ЛД<sub>50</sub>. Кроме того, было изучено влияние ППФ и/или антител к MIF на течение вирусной инфекции на фоне введения MIF.

**Цель и задачи.** Изучить влияние MIF при и/ц введении на течение экспериментальной инфекции, вызванной у мышей ВКЭ, а также изучить влияние ППФ и/или антител к MIF на течение данной инфекции на фоне введения MIF.

**Материалы и методы.** В качестве источника ППФ использовали препарат Фоспренил производства ЗАО «Микро-плюс», содержащий 4 мг полипренилфосфата натрия в 1 мл. ППФ вводили и/ц. В первых экспериментах использовали рекомбинантный MIF, полученный в лаборатории медиаторов и эффекторов иммунитета НИИЭМ им. Н.Ф. Гамалеи, в дальнейшем применяли рекомбинантный человеческий MIF производства фирмы R&D (США). ВКЭ (высокопатогенный для мышей штамм Абсеттаров и вакцинный штамм Софьин) был получен в виде суспензии мозга заболевших мышшей-сосунков беспородных мышшей, зараженных и/ц. Титр ВКЭ составлял 10<sup>9</sup> ЛД<sub>50</sub>. Вирус разводили средой 199 на растворе Эрла до концентрации, соответствующей дозе 1 ЛД<sub>50</sub>, и вводили мышам в/б. Использовали антитела поликлональные человеческие анти-MIF, афинно очищенные, производства фирмы R&D (США). Исходная концентрация антител (АТ) в растворе составляла 1 мг/мл. Согласно инструкции производителя, АТ разводили ФСБ до получения рабочей дозы – 0,05 мг/кг и вводили и/ц в объеме 0,05 мл на 5-е сутки после заражения.

**Результаты.** В сыворотках крови мышей, инфицированных ВКЭ, выявляли стимуляцию продукции MIF в период с 8-х по 10-е сутки после инфицирования – на фоне проявления клинических признаков клещевого энцефалита. Введение инфицированным мышам ППФ, напротив, приводило к подавлению продукции MIF в указанные сроки. При введении MIF в дозе 20 нг мышам, инфицированным ВКЭ, летальность значительно (на 40%) увеличилась, а СПЖ, напротив, сократилась на 2,3 сут. Таким образом, MIF в высоких дозах вызывал утяжеление инфекции, вызванной ВКЭ у мышей. Напротив, введение зараженным мышам ППФ в дозе 60 мкг приводило к защите от инфекции, вызванной ВКЭ, в 100%. Аналогичным образом, и/ц введение АТ к MIF зараженным ВКЭ мышам приводило к существенному снижению показателя летальности – до 26% по сравнению с контролем, и увеличению СПЖ на 5,5 суток. При одновременном введении в мозг зараженных мышей MIF, ППФ и АТ к MIF регистрировалось предотвращение MIF-индуцированного утяжеления тяжести течения КЭ.

**Заключение.** Полученные данные позволяют предположить, что уровень MIF может служить показателем тяжести течения КЭ, а также возможным прогностическим показателем развития менинго-энцефалитической формы КЭ у людей.

#### КЛЕТОЧНЫЙ СОСТАВ КРОВИ У КРЫС ПРИ ДЕЙСТВИИ ИММУНОМОДУЛЯТОРНЫХ ЦИТОКИНОВ

Коплик Е.В., Перцов С.С., Калинин Л.С., Калинина Е.Н.

*НИИ нормальной физиологии им. П.К. Анохина РАМН, Москва, Россия*

Цитокины – группа полипептидных медиаторов межклеточного взаимодействия, участвующих в формировании и регуляции защитных реакций организма при внедрении патогенов и нарушении целостности тканей.

Иммунный статус млекопитающих во многом определяется соотношением про- и противовоспалительных цитокинов, которые, как известно, обладают антагонистическими свойствами. Провоспалительный цитокин интерлейкин-1 $\beta$  является главным медиатором развития местной воспалительной реакции и острофазового ответа на уровне организма, индуцируя каскад секреции других цитокинов в организме (Кетлинский С.А., Симбирцев А.С., 2008). В отличие от этого соединения противовоспалительный цитокин интерлейкин-4 ингибирует продукцию цитокинов, таких как интерлейкин-1 $\beta$ , интерлейкин-6, фактор некроза опухоли- $\alpha$  (Turnbull A., Rivier C., 1999).

Основным механизмом действия интерлейкинов является их регуляторное влияние на пролиферацию, дифференцировку и функциональную активность клеток, принимающих участие в реакциях иммунитета (Кетлинский С.А., Симбирцев А.С., 2008). Однако эффекты цитокинов с разнонаправленным действием на клетки крови у крыс с разными типами поведения практически не изучены.

**Целью работы** было изучение влияния провоспалительного цитокина интерлейкина-1 $\beta$  и противовоспалительного интерлейкина-4 на клеточный состав крови у крыс с разными поведенческими характеристиками.

Эксперименты проведены на 34 крысах самцах Вистар с активным и пассивным паттернами поведения в тесте «открытое поле». Интерлейкин-1 $\beta$ , интерлейкин-4 (5 мкг/кг) или физиологический раствор вводили животным внутривентриально за 2 ч до декапитации. Клеточный состав крови подсчитывали в камере Горяева.

Введение интерлейкина-1 $\beta$  и интерлейкина-4 сопровождалось снижением количества эритроцитов в крови крыс с разными параметрами поведения, а также лейкопенией у активных животных.

Инъекции изученных цитокинов вызывали изменения в лейкоцитарной формуле животных. Введение интерлейкина-1 $\beta$  сопровождалось увеличением числа палочкоядерных и сегментоядерных нейтрофилов в крови активных и пассивных крыс. Отмечено снижение содержания лимфоцитов у особей с разными параметрами поведения на фоне инъекции этого цитокина.

Введение интерлейкина-4 вызывало увеличение количества сегментоядерных нейтрофилов избирательно в крови у поведенчески активных крыс. У этих животных отмечено уменьшение числа лимфоцитов после инъекции интерлейкина-4. Указанные изменения не были выявлены у пассивных животных.

Таким образом, провоспалительный цитокин интерлейкин-1 $\beta$  и противовоспалительный интерлейкин-4 обладают однонаправленным действием на клеточный состав крови у крыс с разными параметрами поведения. Выявленные изменения были более выражены у активных, чем у пассивных животных.

#### ВЛИЯНИЕ МЕСТНОГО ПРИМЕНЕНИЯ БАКТЕРИАЛЬНОГО ЛИПОПОЛИСАХАРИДА НА ПРОЦЕССЫ РЕГЕНЕРАЦИИ КОЖИ

Костарной А.В., Ганчева П.Г., Логунов Д.Ю., Филиппова Н.Е., Народицкий Б.С.

*Федеральное государственное бюджетное учреждение «Научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи» Министерства здравоохранения и социального развития Российской Федерации, Москва, Россия*

Рецепторы врожденного иммунного ответа экспрессируются широким спектром клеток, образующихся или присутствующих в коже, включая иммунокомпетентные клетки. Активация данных рецепторов приводит к запуску биохимических каскадов, индуцирующих секрецию спектра цитокинов, хемокинов, антимикробных пептидов, молекул адгезии и других факторов, которые теоретически могут модулировать процесс регенерации.

В данной работе было исследовано влияние местного применения бактериального липополисахарида *S. typhi*, ЛПС (агониста Toll-подобного рецептора-4, TLR-4) на процесс регенерации кожи на резаных ранах мышей. Было показано, что терапия ЛПС, по сравнению с терапией плацебо, приводит к изменению цитокинового и хемокинового профилей раневого дефекта. В частности, на ранних сроках заживления достоверно повышалась секреция провоспалительных цитокинов IL-1 $\alpha$  и IL-6. Также было установлено статистически значимое повышение секреции СС хемокинов (MIP-1 $\alpha$ , MCP-1, MCP-3, RANTES), являющихся хемоаттрактантами моноцитов, Т-лимфоцитов и ряда других клеток, вовлеченных в про-

цесс регенерации, но не нейтрофилов, в то время как секреция СХС хемокина МІР-2 (хемоаттрактанта нейтрофилов) оставалась без изменений. Показана способность ЛПС значительно повышать уровень секреции ключевых ростовых факторов, необходимых для успешной регенерации кожи (TGF- $\beta$ , VEGF, EGF).

Гистологически было установлено, что местное применение ЛПС дозозависимо усиливает ангиогенез и фиброплазию на ранних сроках заживления, способствует быстрому завершению воспаления, а также обеспечивает лучшее образование и распределение коллагена и уменьшенный объем рубца. Биомеханические исследования показали ЛПС-дозозависимое увеличение прочности раневого дефекта.

Таким образом, местная стимуляция врожденного иммунитета может быть весьма перспективна для разработки лекарственных средств, предназначенных для терапии заболеваний, связанных с задержкой процесса регенерации, например, хронических ран и язв, а также диабетических ран.

### **СРАВНИТЕЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РЕАКЦИИ ИММУННОЙ СИСТЕМЫ САМЦОВ И САМОК КРЫС ВИСТАР В ОТВЕТ НА ВВЕДЕНИЕ ЛИПОПОЛИСАХАРИДА**

**Косырева А.М., Симонова Е.Ю., Макарова О.В.**

*НИИ морфологии человека РАМН, Москва, Россия*

В экспериментальных и клинических исследованиях выявлены половые различия в развитии и тяжести течения инфекционно-воспалительных заболеваний, что указывает на ключевую роль половых стероидов в регуляции иммунного ответа (Deviche P., Cortez L., 2005; Boughton R.K. et al., 2007; Fargallo J.A. et al., 2007). Данные о влиянии половых гормонов на иммунологические и воспалительные реакции противоречивы. Многие авторы указывают на иммуносупрессорные эффекты андрогенов, а эстрогены относят к иммуностимуляторам (Knöferl M.W. et al., 2000; Majetschak M. et al., 2000). Однако другими исследователями было показано, что эстрогены также могут оказывать супрессорное действие на развитие иммунного ответа (Sener G. et al., 2005; Cristofaro P.A. et al., 2006). Поэтому целью работы было сравнительное изучение реакции иммунной системы самок и самцов крыс Вистар в ответ на введение липополисахарида (ЛПС).

В работе использовали 70 половозрелых крыс Вистар обоего пола (питомник «Столбовая»), массой тела 220-270 г. Все эксперименты были выполнены в осенне-зимний период. При работе с экспериментальными животными руководствовались приказом Минздрава СССР № 755 от 12.08.1977 г. С целью изучения половых различий реакции иммунной системы крыс Вистар моделировали воспалительный ответ путем введения опытной группе крыс Вистар ( $n = 50$ ) ЛПС *E. coli* штамма O26:B6 («Sigma», США) в дозе 1,5 мг/кг. Животных выводили из эксперимента на 1-е ( $n = 25$ ) и 7-е сут ( $n = 25$ ) после введения ЛПС. Контрольным группам крыс Вистар ( $n = 20$ ) внутрибрюшинно вводили физиологический раствор. В гистологических срезах органов иммунной системы оценивали объемную долю коркового и мозгового вещества тимуса и функциональных Т- и В-зон селезенки. На гистологических срезах определяли число нейтрофилов в межальвеолярных перегородках легких, проводили

полуколичественную оценку выраженности дистрофических изменений в печени. С целью оценки тяжести поражения печени в сыворотке крови определяли активность индикаторных ферментов АлАТ (КФ 2.6.1.2) и АсАТ (КФ 2.6.1.1). Использовали наборы реактивов «DiaSys» («Diagnostic Systems GmbH», Германия). Методом ИФА определяли содержание неоптерина (IBL, Германия), кортикостерона («Bio Source International», США), общего и свободного тестостерона, эстрадиола и прогестерона в сыворотке крови («Adaltis», Италия), уровень продукции IL-2, IL-4, IL-6, IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$  («Bender MedSystems», США) в культуральной жидкости спленоцитов, активированных конканавалином А. Содержание эндотоксина в сыворотке крови определяли с помощью хромогенного теста (LAL-тест, НВТ, США). Достоверность различий оценивали с помощью непараметрического критерия Манна–Уитни в программе Statistica 7.0, различия считались достоверными при  $p < 0,05$ .

Введение ЛПС самцам и самкам на 1-е сут приводило к повышению содержания эндотоксина в сыворотке крови, уровня продукции IL-2, определяющего развитие иммунного ответа по Th1-типу. Выявлялись признаки акцидентальной инволюции тимуса, опустошение белой пульпы селезенки, что свидетельствует об активации иммунной системы у самцов и самок при остром эндотоксикозе. В эти сроки после введения ЛПС в печени самцов и самок наблюдались дистрофические изменения гепатоцитов, в межальвеолярных перегородках легких увеличивалось число нейтрофилов.

По ряду параметров – реакции иммунной системы, печени и легких крыс Вистар в ответ на введение ЛПС выявлены половые различия. По сравнению с самками на 1-е сут после введения ЛПС у самцов дистрофические изменения в печени и воспалительный процесс в легких был более выражен. При воздействии ЛПС уровень эндотоксина в сыворотке крови самцов повышался в 7 раз по сравнению с контрольной группой, а у самок этот показатель увеличивался только в 3,5 раза. Уровень кортикостерона достоверно повышался только у самцов, у самок этот показатель статистически значимо не изменялся. Содержание интегрального маркера активации клеточного иммунитета – неоптерина у самцов повышался, а у самок наблюдалось его снижение.

Морфометрический анализ показал более выраженную активацию органов иммунной системы у самок по сравнению с самцами в ответ на введение ЛПС. У самок в тимусе развивалась акцидентальная инволюция тимуса II-III стадии, в селезенке были расширены герминативные центры лимфоидных узелков и их маргинальные зоны, выявлялось снижение объемной доли ПАЛМ-зоны.

На 7-е сут после введения ЛПС у животных обоего пола наблюдалось восстановление структуры органов иммунной системы. В тимусе выявлялась акцидентальная инволюция I-II стадии, характеризующаяся расширением его коркового вещества и субкапсулярной зоны, а в селезенке наблюдалось заселение лимфоцитами Т- и В-зон.

Анализ цитокинового профиля показал, что по сравнению с самцами, у которых уровень продукции IL-4, IL-6, IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$  снижалось во все сроки после введения ЛПС, у самок наблюдалось повышение уровня продукции IFN $\gamma$  и IL-4, что характеризует активацию как Th1-, так и Th2-типа иммунного ответа.

Таким образом, по сравнению с самцами самки крыс Вистар в ответ на введение ЛПС характеризуются более выраженной морфофункциональной активацией иммунной системы и менее выраженными воспалительными

и дистрофическими изменениями в легких и печени. Выявленные половые различия реакции иммунной системы на воздействие ЛПС могут определяться протективным и иммуностимулирующим действием физиологических концентраций эстрадиола, а также различиями в кариотипе, что следует учитывать при профилактике и терапии инфекционно-воспалительных заболеваний.

### ИММУННЫЙ ОТВЕТ У ОБЕЗЬЯН ВИДА *MACACA MULATTA* ПРИ ИНТРАНАЗАЛЬНОМ ВВЕДЕНИИ ИСКУССТВЕННО АТТЕНУИРОВАННЫХ БАКТЕРИЙ *BORDETELLA PERTUSSIS*, ПЕРСПЕКТИВНЫХ ДЛЯ СОВЕРШЕНСТВОВАНИЯ ПРОТИВОКОКЛЮШНЫХ ВАКЦИН

Кубрава Д.Т., Медкова А.Ю., Шевцова З.В., Матуа А.З., Синяшина Л.Н., Конджария И.Г., Каратаев Г.И.

Научно-исследовательский Институт Экспериментальной Патологии и Терапии АНА, г. Сухум, Абхазия  
ФГБУ НИИ Эпидемиологии и Микробиологии им. Н.Ф. Гамалеи МЗ РФ, Москва, Россия

Коклюш – антропонозное заболевание, вызываемое бактериями *Bordetella pertussis*. Наиболее тяжело коклюшем болеют новорожденные и дети первого года жизни. Смертность от коклюша наблюдается в основном среди невакцинированных детей до года. Для вакцинации против коклюша в настоящее время применяют два типа вакцин на основе инактивированных вирулентных бактерий (корпускулярная и бесклеточная), вводимых парентерально и обеспечивающих поствакцинальный иммунитет в течение 5–7 лет. Для разработки вакцин, формирующих иммунитет, сопоставимый с иммунитетом после перенесенного заболевания, нами методами генной инженерии сконструированы искусственно аттенуированные бактерии *Bordetella pertussis* KS (ИА В.р KS) для введения в макроорганизм живыми интраназальным путем, естественным для этой инфекции.

**Целью работы** являлось изучение иммунного ответа у обезьян вида *Macaca Mulatta* при интраназальном введении живых ИА В.р KS. Задачей исследования была характеристика врожденного и адаптивного иммунитета при колонизации ИА В.р KS верхних дыхательных путей обезьян.

В работе использованы ИА В.р KS, содержащие две мутации в генах *ptx* и *dnt*; обезьяны вида *Macaca Mulatta* возраста 5–6 лет, половозрелые самцы, весом 7–8 кг, выращенные и содержащиеся в питомнике НИИЭПТ АНА, г. Сухум, Абхазия.

Макак иммунизировали интраназально живыми ИА В.р KS в количестве  $2 \times 10^6$  микробных клеток в 0,5 мл 0,85% раствора хлорида натрия. Показатели иммунного ответа оценивали с 3 по 152 сутки после введения бактерий с интервалом 1–2 недели с помощью РА, реакции радиальной иммунодиффузии в геле по Манчини, иммунофенотипирования лимфоцитов методом Новикова, определения фагоцитарной функции нейтрофилов, НСТ-теста и др.

**Результаты.** 1. В ответ на интраназальное введение живых ИА В.р KS у обезьян при отсутствии внешних клинических признаков коклюша, выявлены лабораторные показатели, характерные для течения коклюшной инфекции у людей. 2. При изучении иммунного ответа у экспериментальных животных в ответ на введение живых ИА

В.р KS зарегистрирована выраженная реакция врожденного и адаптивного иммунитета и образование противокклюшных антител в высокой концентрации.

Таким образом, на модели обезьян вида *Macaca Mulatta* показана перспективность разработки противокклюшных вакцин для интраназального введения на основе искусственно аттенуированных бактерий *B. pertussis* KS.

### ДИСКОРДАНТНОЕ РАЗВИТИЕ ПЕРВИЧНОГО И ВТОРИЧНОГО ИММУННОГО ОТВЕТА ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ ВОЗДЕЙСТВИЯХ

Кудаева О.Т., Гаврилова Е.Д., Ткачев В.О., Гилева И.П., Колесникова О.П.

НИИ клинической иммунологии СО РАМН, г. Новосибирск, Россия  
<sup>1</sup> ФГУН ГНЦ ВБ «Вектор», Новосибирская обл., г. Кольцово, Россия

Развитие первичного гуморального иммунного ответа не заканчивается образованием антителопродуцентов и синтезом антител, но приводит к формированию иммунной памяти, многие аспекты регуляции которой в настоящее время еще далеки от разрешения. Так, не установлено четких и однозначных закономерностей развития анамнестической реакции в связи с выраженностью первичного IgM- или IgG-ответа.

**Целью** настоящего исследования было изучение реципрокных взаимоотношений при развитии первичного и вторичного гуморального ответа в ситуациях его стимуляции и супрессии.

**Материалы и методы.** В работе использовали мышей линии DBA/2 и гибридов (CBA × C57BL/6)F1 и (C57BL/6 × DBA/2)F1 (B6D2F1), самок в возрасте 2 месяцев. Индукцию хронической РТПХ осуществляли путем переноса мышам B6D2F1 лимфоидных клеток родительской линии DBA/2 по  $65 \times 10^6$  клеток внутривенно двукратно с интервалом в пять дней (Kimura M., Gleichmann E., 1987). Гуморальный ответ оценивали по количеству IgM- и IgG-антителообразующих клеток (АОК) в селезенке и костном мозге мышей методом локального гемолиза и по титру гемагглютининов класса IgG (резистентных к 2-мертаптоэтанолу) на пике иммунного ответа. Для стимуляции ответа мышам дополнительно в конце лог-фазы первичного IgM-ответа вводили разные дозы ЭБ (Гаврилова Е.Д. и др., 2007). На пиках первичного IgM- и IgG-ответа у животных определяли концентрацию TNF $\alpha$  методом ELISA. Для отмены возможных эффектов TNF $\alpha$  мышам вводили TNF-связывающий белок вируса натуральной оспы (Gileva I.P. et al., 2006).

**Результаты и обсуждение.** Изучение способности реципиентов с хронической РТПХ (DBA/2 → (C57BL/6 × DBA/2)F1) отвечать на Т-зависимый антиген обнаружило глубокую депрессию первичного IgM- и IgG-ответа. Особенно резко снижается количество IgG-АОК в селезенке, которое составляет от 0,4% до 10,2% контрольных значений. На фоне выраженного угнетения первичного ответа вторичный ответ при хронической РТПХ демонстрирует относительную сохранность, что подтверждается не только менее значительным снижением количества IgG-АОК в селезенке и костном мозге, но и высоким титром антител класса IgG, который у реципиентов не отличается от контрольных значений ( $p > 0,05$ ).

Стимуляция ответа приводит к другому соотношению первичного и вторичного ответа. Дополнительное введение антигена в конце лог-фазы первично-

го IgM-ответа вызывает многократное увеличение числа IgM- и IgG-АОК в селезенке на пике первичного ответа, но в то же время снижает уровень вторичного IgG-ответа. Мыши разных генотипов - (СВА × С57BL/6) F1 и (С57BL/6 × DBA/2)F1 – демонстрируют одинаковую закономерность – подавление анамнестической реакции при резкой стимуляции первичного ответа, отличие проявляется лишь в выраженности супрессии.

Стимуляция первичного ответа сопровождается достоверным возрастанием уровня TNF $\alpha$ , который участвует во многих иммунных процессах, в том числе, является важным фактором физиологических процессов активации В-клеток при иммунном ответе. Связывание TNF $\alpha$  подавляет развитие первичного IgM-ответа, не влияет на первичный IgG-ответ, но стимулирует вторичный IgG-ответ. Полученные результаты свидетельствуют о возможной роли TNF $\alpha$  в изменении физиологического баланса процессов дифференцировки В-лимфоцитов в антителопродуценты и клетки памяти.

Таким образом, регуляция первичного и вторичного гуморального иммунного ответа осуществляется разными механизмами, возможно, конкурирующими между собой.

#### РОЛЬ ЭТАНОЛ-ИНДУЦИРОВАННОГО СТРЕССА В РЕГУЛЯЦИИ ЭКСПРЕССИИ БЕЛКА МІСА

Кучукова А.А., Стрельцова М.А., Каневский Л.М., Коваленко Е.И.

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

Белок МІСА (MHC class I-related chain A) является мембранным белком, который обнаруживается на поверхности клеток при опухолевой трансформации, инфицировании и клеточном стрессе. На эффекторах клеточного иммунитета, цитотоксических Т-лимфоцитах и натуральных киллерах, имеется рецептор NKG2D, специфичный к МІСА. С помощью NKG2D клетки-киллеры распознают и уничтожают трансформированные и стрессированные клетки. Также показано, что для многих опухолей характерен феномен сбрасывания молекул МІСА с поверхности клеток с образованием растворимой формы белка sMІСА, способной ослаблять функции NK-клеток, в частности, за счет снижения поверхностной экспрессии NKG2D. Механизмы регуляции экспрессии МІСА до сих пор не ясны. Известно, что алкоголь, в частности этанол, способен вызывать клеточный стресс.

**Целью** данной работы стал анализ влияния этанола на экспрессию МІСА в клетках линий гемопозитического происхождения: K562 (человеческая эритробластная лейкомия), Jurkat (человеческая Т-клеточная лейкомия) и ТНР-1 (человеческая острая моноцитарная лейкомия), а также в лейкоцитах здоровых доноров.

Оценка поверхностной экспрессии МІСА была выполнена с помощью метода проточной цитометрии и конфокальной микроскопии. Экспрессия гена mіса оценивалась с помощью метода обратной транскрипции с последующей полимеразной цепной реакцией.

Был определен значительный уровень спонтанной экспрессии МІСА в клетках K562 и ТНР-1 по сравнению с клетками Jurkat. Инкубация клеток в присутствии этанола (0,5-3%) приводила к увеличению экспрессии МІСА. Также обработка клеток этанолом приводила к частичной элиминации МІСА с клеточной поверх-

ности. Значительное влияние на увеличение поверхностной экспрессии МІСА под действием этанола оказывала клеточная плотность. При инкубации клеток с этиловым спиртом в малой плотности (200 тыс. кл./мл) увеличение экспрессии МІСА было значительным. В то же время при высокой клеточной плотности (1-2 млн кл./мл) заметного увеличения количества МІСА на клеточной мембране не отмечалось, что, вероятно, было следствием роста высвобождения белка с поверхности клеток и образования sMІСА. Дальнейшее увеличение концентрации этанола (более 3%) приводило к уменьшению поверхностной экспрессии МІСА и росту клеточной гибели. Также было обнаружено, что белок МІСА экспрессируется на поверхности моноцитов человека, но отсутствует на поверхности Т-клеток. При этом количество МІСА на поверхности CD14-положительных лейкоцитов также возрастало под действием этанола (0,25-1%). Хотя исследованные клеточные линии и клетки крови различались по уровню поверхностной экспрессии МІСА, мРНК mіса была найдена во всех клетках.

Таким образом, было показано, что под действием этилового спирта увеличивается поверхностная экспрессия стресс-индуцированного белка МІСА, а также происходит высвобождение МІСА с поверхности.

#### КОМПОНЕНТЫ *STREPTOCOCCUS PYOGENES* ИЗМЕНЯЮТ АКТИВНОСТЬ АДГЕЗИИ МОНОЦИТОВ К ЭНДОТЕЛИАЛЬНЫМ КЛЕТКАМ

Лебедева А.М., Старикова Э.А., Бурова Л.А., Фрейдлин И.С.

НИИ экспериментальной медицины СЗО РАМН, Санкт-Петербург, Россия

**Введение.** На поверхности гноеродных стрептококков экспрессируется широкий спектр патоген-ассоциированных молекулярных паттернов (PAMPs), которые связываются с паттернраспознающими рецепторами (PRR) эукариотических клеток и запускают сигнальные пути активации ряда функций этих клеток. В частности, меняются адгезионные свойства клеток и активности их взаимной адгезии.

**Цель** нашего исследования состояла в изучении изменений адгезионных свойств и активности адгезии моноцитоподобных клеток линии ТНР-1 к эндотелиальным клеткам линии EA.hy926 под влиянием ультразвукового лизата *Streptococcus pyogenes*.

**Материалы и методы.** В работе использовался супернатант разрушенных ультразвуком *Streptococcus pyogenes* типа M22, стерилизованный фильтрацией («лизат стрептококка»). Клетки перевиваемой линии ТНР-1, которые по основным характеристикам соответствуют не дифференцированным промоноцитам человека, и клетки линии EA.hy926, по генотипическим и фенотипическим характеристикам соответствующие эндотелиальным клеткам макрососудов человека, культивировали в среде с необходимыми добавками (полная культуральная среда – ПКС), при 37 °С во влажной атмосфере с 5% CO<sub>2</sub>. Экспрессию поверхностных молекул оценивали с использованием и моноклональных антител, меченых FITC или PE и проточной цитометрии после суточной инкубации с лизатом стрептококка. Для оценки интенсивности адгезии клеток к пластику использовали колориметрический метод после фиксации и окрашивания клеток 0,2% раствором кристаллического-фиолетового. Для исследования интенсивности адгезии клеток линии ТНР-1

к монослою эндотелиальных клеток использовали метод, основанный на окраске внутриклеточного белка клеток линии ТНР-1 витальным флуоресцентным красителем *carboxyfluorescein succinimidyl ester* (CFSE) с последующей флуориметрией. Оценку достоверности различий между уровнями показателей в контрольных и опытных культурах клеток проводили с использованием критерия Стьюдента.

**Результаты.** «Лизат стрептококка» достоверно усиливал экспрессию адгезионных молекул CD54 и CD99 на клетках ТНР-1, не оказывая достоверного влияния на экспрессию молекул CD11b. В отличие от этого, тот же «лизат стрептококка» не оказывал достоверного влияния на экспрессию молекул CD99, CD106, CD54 на поверхности эндотелиальных клеток. При инкубации моноцитоподобных клеток линии ТНР-1 с «лизатом стрептококка» в течение 2,5 часов, интенсивность адгезии клеток к пластику достоверно увеличивалась по сравнению с интенсивностью адгезии при инкубации клеток в ПКС. Напротив, инкубация эндотелиальных клеток с «лизатом стрептококка» приводила к достоверному снижению интенсивности адгезии эндотелиальных клеток к пластику по сравнению с интенсивностью адгезии клеток при культивировании в стандартных условиях. Более информативным тестом является адгезия клеток ТНР-1 к монослою эндотелиальных клеток. Суточная преинкубация клеток линии ТНР-1 с «лизатом стрептококка» снижала интенсивность их адгезии к интактному эндотелию. Напротив, интенсивность адгезии интактных моноцитоподобных клеток к эндотелиальным клеткам, преинкубированным с «лизатом стрептококка», была достоверно повышена по сравнению с контролем. В случае предварительной инкубации с «лизатом стрептококка» и тех и других клеток наблюдали достоверное снижение интенсивности адгезии по сравнению с контрольным уровнем. Оценка интенсивности адгезии моноцитоподобных клеток к эндотелиальным клеткам в присутствии «лизата стрептококка» по сравнению с интенсивностью адгезии этих клеток в присутствии ПКС выявила достоверное повышение.

**Заключение.** Полученные результаты позволяют нам предположить, что компоненты стрептококка оказывают разнонаправленное действие на адгезивность моноцитоподобных и эндотелиальных клеток, но интенсивность процесса адгезии моноцитоподобных клеток к эндотелиальным клеткам в присутствии компонентов стрептококка существенно возрастает.

#### **ЦИТОТОКСИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ МОНОНУКЛЕАРНЫХ ЛЕЙКОЦИТОВ МЫШЕЙ ПРИ ДЕЙСТВИИ ИММУНОМОДУЛИРУЮЩИХ ПРЕПАРАТОВ РАЗЛИЧНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ**

Лебединская О.В.<sup>1</sup>, Лебединская Е.А.<sup>1</sup>,  
Годовалов А.П.<sup>1</sup>, Ахматова Н.К.<sup>2</sup>

<sup>1</sup> ГОУ ВПО «Пермская государственная медицинская академия им. ак. Е.А. Вагнера Росздрава», г. Пермь, Россия

<sup>2</sup> Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова, РАМН, Москва, Россия

В настоящее время в литературе обсуждается вопрос о возможности регуляции механизмов врожденного иммунитета при помощи препаратов, несущих в своем со-

ставе патоген-ассоциированные молекулярные структуры микроорганизмов.

**Цель исследования:** изучение влияния иммуномодуляторов различного происхождения на цитотоксическую активность мононуклеарных лейкоцитов (МЛ) мышей.

В исследованиях на мышцах линии СВА и Balb/c использовали препараты: поликомпонентную вакцину Иммуновак, состоящую из антигенных компонентов *St. aureus*, *K. pneumoniae*, *P. vulgaris* и *E. Coli*; стафилопротейно-синегнойную жидкую вакцину (СПСА); стимуфорте (водную вытяжку из органов и тканей ужей); фукоидан (сульфатированный гетерополисахарид из бурых водорослей) и нуклеинат натрия (низкомолекулярную NaPHK, полученную при гидролизе кормовых дрожжей), которые вводили внутривентрально. Мононуклеарные лейкоциты выделяли из селезенки мышей в результате градиентного центрифугирования клеточной взвеси. Цитотоксическую активность МЛ определяли на NK-зависимых линиях клеток мышшиной лимфомы YAC-1 и эритробластного лейкоза К-562 в тесте восстановления 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолия бромида (МТТ-тест).

Цитотоксическая активность МЛ повышается с увеличением соотношения опухолевых и эффекторных клеток при действии всех исследуемых препаратов. Так, при соотношении клетки-мишени/клетки-эффекторы 1:5 Иммуновак усиливает киллерную способность эффекторных клеток в 3,6 раза, нуклеинат натрия – в 2,8 раза. Под влиянием стимуфорте цитотоксическая активность МЛ мышей повышается при соотношении клетки-эффекторы/мишени 1:10 – в 1,3 раза. Для СПСА и фукоидана характерна дозозависимая активация цитотоксичности при введении иммуномодуляторов в культуры МЛ. Максимальная цитотоксическая активность МЛ отмечена при концентрации СПСА 100 мкг/мл, а фукоидана – 10 мкг/мл. На величину киллерной активности мононуклеарных лейкоцитов оказывает влияние время действия препаратов. Например, СПСА вызывает наибольший цитотоксический эффект у МЛ через 24 часа, а нуклеинат натрия – через 120 часов после введения иммуномодуляторов.

Таким образом, все исследованные иммуномодулирующие препараты оказывают стимулирующее действие на клетки-эффекторы врожденного иммунитета и вызывают пролиферативные процессы в лимфоидной ткани различных зон иммунокомпетентных органов. Наибольшей активностью обладают иммуномодуляторы бактериального происхождения, поскольку в их составе имеются патоген-ассоциированные молекулярные структуры микроорганизмов, являющиеся лигандами для рецепторов клеток врожденного иммунитета и приводящие к их активации. Представляется целесообразным проведение клинических испытаний изученных иммуномодулирующих препаратов с целью их последующего использования в терапевтической практике.

## НЕКОТОРЫЕ ОСОБЕННОСТИ ФАРМАКОДИНАМИКИ ЦИКЛОФОСФАНА У ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ ЖИВОТНЫХ

Лосева Л.Ф.<sup>1</sup>, Доненко Ф.В.<sup>2</sup>, Лебединская О.В.<sup>3</sup>, Ахматов Э.А.<sup>1</sup>, Лебединская Е.А.<sup>3</sup>, Годовалов А.П.<sup>3</sup>, Мелехин С.В.<sup>3</sup>

<sup>1</sup> ГУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова РАМН», Москва, Россия

<sup>2</sup> ГУ «Российский онкологический научный центр им. Н.Н. Блохина», Москва, Россия

<sup>3</sup> ГОУ ВПО Пермская государственная медицинская академия им. ак. Е.А. Вагнера Росздрава, г. Пермь, Россия

Создание и внедрение в клиническую практику новых противоопухолевых препаратов открывает новые возможности в химиотерапии онкологических заболеваний.

**Целью исследования** явилось изучение влияния различных режимов введения циклофосфана (ЦФ) экспериментальным животным на содержание его реактивных метаболитов, а также оценка токсических свойств этого препарата.

Содержание реактивных метаболитов ЦФ определяли в плазме крови у мышей по методу Friedman и Roger, модифицированному Alberts. ЦФ вводили мышам линии СВА массой 23-26 г внутривенно однократно в дозе 100 мг/кг массы тела, двукратно или трехкратно с 72-часовым интервалом. Для определения периода полуэлиминации реактивных метаболитов циклофосфана выявляли их количественное содержание в плазме крови мышей в мг/мл плазмы. Затем вычисляли десятичный логарифм концентрации реактивных метаболитов в течение 6 часов через различные промежутки времени после введения циклофосфана. Кроме того определяли массу животных и число лейкоцитов в их периферической крови после каждого введения цитостатика.

Проведенные исследования показали, что однократное введение ЦФ не влияет на массу тела животных (в контрольной группе –  $21,7 \pm 2,1$  г). На третьи сутки после двукратного введения ЦФ масса мышей составляла  $19,8 \pm 1,7$  г. Статистически значимое уменьшение массы тела наблюдалось на третьи (до  $17,9 \pm 1,1$  г) и шестые (до  $18,7 \pm 1,1$  г) сутки после трехкратного введения цитостатика. К двенадцатым суткам при данном режиме введения ЦФ масса тела животных восстановилась до  $20,1 \pm 1,3$  г.

Общетоксическое действие ЦФ проявлялось в изменении числа лейкоцитов периферической крови. На 3-5-й день после введения ЦФ формировалась выраженная лейкопения. При двукратном введении ЦФ лейкопения наблюдалась с 3 по 8-й день, а при трехкратном введении ЦФ возникала стойкая лейкопения, которая держалась более 10 суток.

Однократное введение ЦФ сразу повышало концентрацию реактивных метаболитов ЦФ в плазме крови, которые достигали максимума через 10 мин после введения препарата и снижались до нуля через 3 часа. Максимум концентрации реактивных метаболитов наблюдается через 15 мин после двукратного введения ЦФ. Максимальная концентрация реактивных метаболитов при двукратном введении ЦФ была меньше, чем при однократном. Это связано с тем, что изначально ЦФ не обладает ни цитотоксической, ни алкилирующей активностью. Для появления реактивных метаболитов ЦФ нуждается в мета-

болической активации монооксигеназами печени. Однако при образовании реактивных метаболитов ЦФ они повреждают гепатоциты (в которых находятся монооксигеназы), и активность ферментных систем клеток печени снижается. Полное исчезновение реактивных метаболитов ЦФ в плазме крови экспериментальных мышей наблюдалось через 5 часов при любом режиме введения цитостатика.

Таким образом, изучение фармакокинетики реактивных метаболитов ЦФ показывает, что препарат быстро метаболизируется в печени и обладает выраженным кумулятивным эффектом. Установлено изменение фармакокинетики циклофосфана, снижение уровня его реактивных метаболитов и расширение пика их максимальной концентрации. Трехкратное введение ЦФ оказывает общетоксическое действие, но не приводит к гибели животных. Продолжительность нарушений при трехкратном введении циклофосфана позволяет использовать данный режим для создания модели индуцированной иммуносупрессии.

## МЕХАНИЗМ РАЗВИТИЯ ИНВОЛЮЦИИ ТИМУСА ПРИ ОПУХОЛЕВОМ РОСТЕ: РОЛЬ VEGF И SEMA3A

Лямина И.В., Киселева Е.П.

НИИ экспериментальной медицины СЗО РАМН, Санкт-Петербург, Россия

Рост многих опухолей человека и животных сопровождается инволюцией тимуса. Одним из предполагаемых механизмов является усиленный выход тимоцитов на периферию, в котором могут быть задействованы различные факторы. Показано, что введение фактора роста эндотелия сосудов (VEGF) интактным мышам приводит к атрофии вилочковой железы. Семафорин 3А (Sema3A), отвечающий за рост аксонов в нервной системе, имеет общий рецептор с VEGF – нейропилин-1. При этом между факторами может возникать конкуренция за связывание. Известно, что VEGF и Sema3A оказывают влияние на миграцию различных клеток организма, в том числе и клеток иммунной системы.

**Целью** данного исследования было изучить влияние VEGF и Sema3A на миграционную активность тимоцитов и экспрессию этих факторов в ходе опухолевого роста в строме тимуса. Работа проводилась на самцах мышей линии СЗНА. Миграцию *in vitro* проводили с использованием системы трансвеллов. При этом тимоциты в среде DMEM помещали в верхние камеры, а исследуемые факторы в верхние (хеморепеллентия) и/или нижние (хемотаксис). Миграцию проводили в течение 4 часов в CO<sub>2</sub>-инкубаторе. При изучении трансэндотелиальной миграции (ТЭМ) и адгезии в лунки предварительно внесли клетки эндотелия EA.hy926 до образования монослоя, а затем тимоциты. Содержание белка VEGF в экстрактах стромы тимуса изучали с использованием ИФА-набора (R&D), экспрессию Sema3A в строме – с помощью Вестерн-блота.

VEGF (100 нг/мл) при добавлении в нижние камеры трансвеллов проявлял хемотаксические свойства по отношению к тимоцитам (усиление миграции в 1,4 раза по сравнению с контролем). Предобработка эндотелия VEGF приводила к усилению адгезии к эндотелию и ТЭМ тимоцитов (в 1,5 и 2 раза соответственно). Sema3A (100 нг/мл), напротив, оказывал хеморепеллентный эффект при добавлении фактора в верхние камеры (в 1,6 раза по сравнению со спонтанной миграцией)

и не оказывал влияния на адгезию тимоцитов к эндотелиальным клеткам. В ходе роста прививаемой гепатомы 22a содержание белка VEGF в строме тимуса не изменялась ( $8,33 \pm 0,7$  мкг/1 мг белка у интактных мышей и  $7,84 \pm 0,6$  мкг/1 мг белка на 28 день опухолевого роста), но усиливалась экспрессия Sema3A.

Таким образом, на основании полученных результатов можно предположить, что Sema3A, выступая в качестве хеморепеллента, участвует в инволюции тимуса при опухолевом росте за счет механизма усиленной эмиграции тимоцитов. VEGF может усиливать этот процесс, влияя непосредственно на эндотелий и усиливая ТЭМ тимоцитов. Работа поддержана грантом РФФИ № 09-04-00429.

## АНТИГЕНПРЕЗЕНТИРУЮЩИЕ КЛЕТКИ И РЕПЛИКАЦИЯ ВИЧ-1 В CD4<sup>+</sup> ЛИМФОЦИТАХ

Макарова М.В.<sup>1</sup>, Мустафин И.Г.<sup>2</sup>, Бойчук С.В.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Казанский государственный медицинский университет, Республика Татарстан, г. Казань

<sup>2</sup> Республиканский ЦПБ СПИД МЗ РТ, Республика Татарстан, г. Казань

**Введение.** Установлено, что пусковыми механизмами активации CD4<sup>+</sup> лимфоцитов, являющихся основными мишенями для ВИЧ-1, являются их взаимодействия с профессиональными антигенпрезентирующими клетками (АПК), локализующимися, в основном, в лимфоидной ткани. Данный факт, являющийся убедительно доказанным и неоспоримым, тем не менее, не объясняет механизмов репликации ВИЧ-1 и выраженности вирусемии на стадиях прогрессирования заболевания и развития СПИДа, сопровождающихся, как известно, деструктивными изменениями герминативных центров лимфоидных органов.

**Цель исследования.** Исследована роль антигенпрезентирующих клеток (АПК) разного типа (макрофаги, дендритные клетки, эндотелиальные клетки) в процессах репликации ВИЧ-1 в CD4<sup>+</sup> лимфоцитах.

**Материалы и методы.** Инфицирование лимфоцитов ВИЧ-1 проводили в условиях культивирования клеток в присутствии АПК. Количество лимфоцитов, инфицированных ВИЧ-1, определяли методом проточной цитометрии по внутриклеточной экспрессии p24<sup>gag</sup> белка ВИЧ-1. Репликацию ВИЧ-1 определяли по уровню p24<sup>gag</sup> белка в супернатанте клеточных культур методом ИФА.

**Результаты.** Установлено, что репликация ВИЧ-1 в CD4<sup>+</sup> лимфоцитах индуцируется разными типами АПК. В контроле (неактивированные лимфоциты) репликация ВИЧ-1 не регистрировалась. Эндотелиальные клетки относят к факультативным АПК и индукцию репликации ВИЧ-1 в лимфоцитах наблюдалась лишь после предварительной активации эндотелиальных клеток (ЭК) IFN $\gamma$ . Пик репликации ВИЧ-1 в культуре лимфоцитов, инкубированных с ЭК наблюдался на 9-10 сутки после инфицирования и коррелировал с количеством ВИЧ-инфицированных клеток. Дендритные клетки индуцировали репликацию ВИЧ-1 в CD4<sup>+</sup> лимфоцитах, и пик репликации отмечался на 6 день культивирования, тогда как в культуре с макрофагами пик репликации наблюдался на 8 день. Профессиональные АПК (ДК и Мф) обладают способностью инициировать репликацию ВИЧ-1 как в «наивных» Т-лимфоцитов, так и Т-лимфоцитов, относящихся к пулу клеток-памяти. Основным пулом клеток-продуцентов ВИЧ-1 в экспериментальной модели с ЭК являются CD4<sup>+</sup> лимфоциты, относящиеся

к клеткам-памяти (CD45RO), в то время как «наивные» Т-лимфоциты, культивированные в присутствии ЭК, не являются источником вирусной репликации. Наибольший индуцирующий эффект АПК в отношении репликации ВИЧ-1 был выявлен у ЭК. Для выяснения роли растворимых факторов были проведены эксперименты с культивированием ЭК и CD4<sup>+</sup> лимфоцитов, разделенных полупроницаемой мембраной. Было выявлено, что инфицирование вирусом CD4<sup>+</sup> лимфоцитов, разделенных от ЭК полупроницаемой мембраной, существенным образом снижало репликацию ВИЧ-1. При исследовании роли лиганд-рецепторных взаимоотношений между ЭК и CD4<sup>+</sup> лимфоцитами в репликации ВИЧ-1 были использованы «блокирующие» МАТ к молекулам CD2, LFA1, DS-SIGN и МНС II класса. Для достижения оптимальной концентрации МАТ, последние вносили в культуру клеток каждые 3 дня во время замены половины среды для культивирования. Было выявлено, что внесение в культуру ЭК/CD4<sup>+</sup> лимфоцитов МАТ, блокирующих CD58/LFA-3, CD2/LFA-2 и ICAM-1/LFA-1 взаимодействия индуцировало снижение репликации ВИЧ-1 ( $p < 0,001$ ). Наибольшее снижение уровня вирусной репликации достигалось при использовании МАТ к молекулам гистосовместимости II класса. Применение МАТ к CD2 молекуле, а также LFA-1 в меньшей степени ингибировало репликацию ВИЧ-1. Использование МАТ к молекуле DC-SIGN не оказывало влияния на репликацию ВИЧ-1 в использованной нами экспериментальной модели. Культивирование как ДК, так и Мф с CD4<sup>+</sup> лимфоцитов в присутствии анти-CD80 и анти-CD86 МАТ к существенному подавлению вирусной репликации ( $p < 0,001$ ). Использование МАТ к молекулам МНС II класса также оказывало выраженный ингибирующий эффект ( $p < 0,001$ ). Внесение в культуру ДК/CD4<sup>+</sup> лимфоцитов, Мф/CD4<sup>+</sup> лимфоцитов анти-CD2 МАТ, а также анти-LFA1 МАТ не оказывало аналогичного эффекта. Блокада рецептора DC-SIGN с помощью МАТ приводила к умеренному подавлению вирусной репликации.

**Заключение.** Профессиональные и факультативные антигенпрезентирующие клетки индуцируют репликацию ВИЧ-1 в CD4<sup>+</sup> лимфоцитах. Индукция репликации ВИЧ-1 в CD4<sup>+</sup> лимфоцитах антигенпрезентирующими клетками обусловлена главным образом межклеточными взаимодействиями.

## АДЬЮВАНТНЫЕ СВОЙСТВА ПРОИЗВОДНЫХ ХИТОЗАНА, ПРОЯВЛЯЕМЫЕ ПРИ МУКОЗАЛЬНОЙ ВАКЦИНАЦИИ ЖИВОЙ И ИНАКТИВИРОВАННОЙ ГРИППОЗНЫМИ ВАКЦИНАМИ

Маркушин С.Г., Гендон Ю.З., Кривцов Г.Г., Аюпова И.И., Коптяева И.Б., Сухно А.С., Переверзев А.Д.

НИИВиС им. И.И. Мечникова РАМН, Москва, Россия

Вакцинация является наиболее эффективным средством профилактики гриппозных инфекций. Помимо инактивированных гриппозных вакцин в настоящее время широко используются живые холодоадаптированные гриппозные вакцины. Живые ха гриппозные вакцины индуцируют нейтрализующие секреторные IgA антитела, являются стимуляторами местного иммунного ответа и вызывают иммунную защиту от дрейфовых вариантов вируса гриппа. Однако они обладают сниженной профилактической активностью для лиц пожилого возраста. Иммуногенность инактивированных вирусных вакцин

повышают адьюванты. В последнее время было показано, что инактивированные гриппозные вакцины можно использовать при мукозальном введении, применяя адьюванты, в частности, катионный полисахарид естественного происхождения – хитозан. Хитозан также был успешно использован в качестве адьюванта при парентеральном введении инактивированных гриппозных вакцин. Исследованием адьювантных свойств хитозана занимается лаборатория генетики РНК-содержащих вирусов НИИВиС им. И.И. Мечникова РАМН.

**Цель и задачи:** исследовать возможность повышения защитного эффекта живой ха гриппозной вакцины с помощью адьювантов (производных хитозана); провести сравнение адьювантных свойств производных хитозана при мукозальной иммунизации живой и инактивированной гриппозными вакцинами; изучить иммунные реакции организма подопытных животных при мукозальном введении живой и инактивированной гриппозных вакцин с хитозановыми адьювантами. Использованы 1) вирусы: ха донор аттенуации штамм вируса гриппа А/Краснодар/101/35/59(H2N2) и эпидемический штамм вируса гриппа А/Краснодар/101/59(H2N2) из коллекции отдела вирусологии; 2) адьюванты: глютамат хитозана (300kD), деацетилованный на 85% (рН 6.2) в конечной концентрации 0,5%; 1% суспензия микрочастиц сульфата хитозана (1000-3000 нм); 3) вакцины: ха штамм вируса гриппа А/Краснодар/101/35/59 (H2N2); инактивированная расщепленная гриппозная вакцина «Ваксигрипп» (Sanofi Pasteur, Франция). Беспородных мышей (10-12 г) двукратно (с интервалом 21 день) интраназально иммунизировали заданными дозами. Через 10 дней после иммунизации определялось наличие антител в крови. Сравнялся титр сывороточных антител в РТГА. Для изучения защитного эффекта мышей инфицировали интраназально вирулентным штаммом А\Краснодар/101/59 (H2N2) в дозе 105.5 ЭИД50/0.05 мл. Через 3-4 дня из легких готовили 10% суспензию, титровали ее путем заражения 10-дневных куриных эмбрионов.

**Результаты.** Выявлено, что при интраназальной иммунизации мышей ха штаммом донором аттенуации введение в вакцинный материал глютамата хитозана повышает содержание сывороточных IgG, секреторных IgA и защитный эффект иммунизации. Добавление адьюванта к ха штамму донору не вызывает изменения ts- маркера ха штамма. Инактивированный УФ облучением ха штамм донор в комбинации с адьювантом не защищает от инфицирования вирулентным штаммом А/Краснодар/101/59 (H2N2) в отличие от интактного ха штамма донора с хитозаном. Хитозан не увеличивает размножение ха штамма донора в верхних дыхательных путях. Титры секреторных IgA были существенно выше во всех отделах респираторного тракта и легких мышей, иммунизированных живой ха гриппозной вакциной.

По нашим данным, хитозан значительно активнее повышает индукцию секреторных IgA антител у мышей, иммунизированных ха штаммом донором аттенуации А/Краснодар /101/35/59, но обладает незначительным адьювантным эффектом при индукции секреторных IgA антител у мышей, иммунизированных инактивированной гриппозной вакциной.

При сравнении адьювантного эффекта было обнаружено некоторое преимущество суспензии микрочастиц сульфата хитозана над раствором глютамата хитозана (рН 6.2). Объективные данные о сравнительной адьювантной эффективности этих форм хитозана можно будет получить после детального изучения стимуляции всех

звеньев иммунного ответа у иммунизированных животных.

**Заключение.** Показана принципиальная возможность повышения защитного эффекта гриппозных вакцин при использовании хитозана в качестве адьюванта.

Сравнение титров сывороточных антител в РТГА показало некоторое преимущество использования микрочастиц сульфата хитозана по сравнению с глютаматом хитозана.

Живая гриппозная вакцина в сочетании с хитозаном дает более высокий защитный эффект, чем инактивированная гриппозная вакцина.

### **АЦЕТИЛИРОВАННЫЕ И ОКИСЛЕННЫЕ ЛИПОПРОТЕИНЫ НИЗКОЙ ПЛОТНОСТИ УСИЛИВАЮТ ЭКСПРЕССИЮ И СЕКРЕЦИЮ КОМПОНЕНТА КОМПЛЕМЕНТА C3 МАКРОФАГАМИ ЧЕЛОВЕКА: РОЛЬ TLR4 И ЯДЕРНЫХ РЕЦЕПТОРОВ LXR**

**Могиленко Д.А., Кудрявцев И.В., Шавва В.С., Баженова М.А., Орлов С.В.**

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

Компонент комплемента C3 является ключевым белком, который участвует в трех каскадах активации комплемента, а также обладает иммунорегуляторными свойствами, направленными на дифференцировку В и Т-лимфоцитов и созревание дендритных клеток. C3 вовлечен в процессы формирования атерогенных повреждений сосудов, однако, механизм накопления C3 в атероме плохо изучен. Мало известно про экспрессию и синтез C3 в ходе превращения макрофагов в пенные клетки при захвате модифицированных липопротеинов низкой плотности (мЛПНП).

Было показано, что ацетилованные и окисленные липопротеины низкой плотности (ацЛПНП и оЛПНП) увеличивают экспрессию гена и секрецию белка C3 макрофагоподобными клетками ТНР-1 и макрофагами, полученными из моноцитов периферической крови человека. При помощи Real Time RT-PCR было установлено, что мЛПНП усиливают экспрессию C3 в макрофагах человека уже через 24 ч и уровень транскрипции гена C3 остается повышенным даже через 4 суток после добавления к клеткам мЛПНП. При помощи сортировки клеток методами проточной цитофлуориметрии с последующим выделением РНК было установлено, что значительное увеличение экспрессии гена C3 наблюдается в клетках, захватывающих мЛПНП, в то время как макрофаги, не захватывающие мЛПНП, лишь незначительно увеличивают экспрессию C3 находясь в среде с мЛПНП. Используя синтетический агонист ядерного рецептора LXR и блокирующие антитела для TLR4, было показано, что мЛПНП усиливают экспрессию гена C3 через активацию LXR и частично TLR4, в то время как мЛПНП-зависимое усиление секреции C3 требует участия TLR4. В промоторе гена C3 человека был идентифицирован сайт для связывания LXR, методами задержки ДНК-белковых комплексов в геле и иммунопреципитации хроматина было продемонстрировано, что LXRβ взаимодействует с этим сайтом в макрофагах ТНР-1. Следует отметить, что промотор гена C3 мыши лишен сайта связывания LXR, и экспрессия C3 мыши не увеличивается при обработке перитонеальных макрофагов мыши агонистом LXR. В ходе собственных экспериментов установлено, что обработка макрофагов человека IL-4 (так называемые альтернативно

активированные макрофаги – M2 макрофаги) подавляет экспрессию и секрецию С3, однако лиганд-зависимая активация LXR приводит к большему увеличению уровня экспрессии С3 по сравнению с макрофагами, дифференцировавшимися в отсутствие IL-4. В то же время в таких макрофагах обнаруживается увеличенный уровень LXR $\beta$ , связанного с промотером гена С3. Несмотря на значительную активацию экспрессии гена С3 в M2 макрофагах, обработка мЛПНП приводит к меньшей стимуляции секреции в таких клетках по сравнению с макрофагами, дифференцированными в отсутствие IL-4. Одновременно с этим, M2 макрофаги демонстрируют сниженную экспрессию поверхностного TLR4, что может объяснить сниженную активацию секреции С3 в ответ на мЛПНП. Для изучения возможных последствий увеличенной секреции С3 макрофагами, захватывающими мЛПНП, мы обрабатывали макрофаги человека очищенным С3а. Дифференцировка макрофагов в присутствии 10 нМ С3а приводит к усилению захвата окЛПНП и стимулирует окЛПНП-зависимое увеличение экспрессии С3.

Полученные результаты показывают новый механизм мЛПНП-зависимого увеличения экспрессии и секреции С3 макрофагами в атеросклеротических повреждениях сосудов. Кроме того, С3 ген человека впервые идентифицирован как прямая мишень для регуляции со стороны ядерных рецепторов LXR, лигандами для которых являются оксистеролы, накапливающиеся в макрофагах в ходе их превращения в пенистые клетки.

### **Fc-РЕЦЕПТОРЫ – УНИВЕРСАЛЬНОЕ ЗВЕНО МЕХАНИЗМА ОПСОНИЗАЦИИ ДЛЯ ВРОЖДЕННОГО И АДАПТИВНОГО ИММУНИТЕТА**

Назаров П.Г.

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

Fc-рецепторы (FcR) представляют собой гетерогенную группу мембранных гликопротеинов, способствующих взаимодействию комплексов антиген-антитело с эффекторными клетками иммунной системы. У млекопитающих они регулируют многие гуморальные и клеточные процессы: фагоцитоз, дегрануляцию, антитело-зависимую цитотоксичность, регуляцию транскрипции и экспрессии цитокинов и хемокинов, активацию В-лимфоцитов, клиренс иммунных комплексов. Fc-рецепторы различаются по родству к подклассам IgG [Fc $\gamma$ R1 (CD64), Fc $\gamma$ RII (CD32), Fc $\gamma$ RIII (CD16)] и по способности усиливать или ингибировать иммунные реакции, такие как фагоцитоз, цитотоксичность, дегрануляция, презентация антигена, продукция цитокинов, благодаря наличию в цитоплазматической части активирующего (ITAM) или ингибиторного (ITIM) пептидов (у Fc $\gamma$ R1, Fc $\gamma$ RIIA/C, Fc $\gamma$ RIII и Fc $\gamma$ RIIIb, соответственно). Предполагают, что эволюционный возраст Fc-рецепторов больше возраста иммуноглобулинов и сопоставим с возрастом пентраксинов, с которыми функция Fc-рецепторов первично связана. Многократно показано разными авторами, что Fc-рецепторы (например, Fc $\gamma$ R, Fc $\alpha$ R) связывают не только иммуноглобулины, но и многие пентраксины, такие как С-реактивный белок, сывороточный Р-компонент амилоида, РТХ3. Эволюционный возраст пентраксинов значительно превосходит возраст иммуноглобулинов. Пентраксины присутствуют уже у беспозвоночных (например, у мечехвоста *Limulus polyphemus*), тогда как иммуноглобулины появляются только у позвоноч-

ных (хрящевые рыбы), т.е. значительно позже. Пентраксины иногда называют «протоантителами», т.к. они напоминают антитела многими свойствами. Подобно антителам, пентраксины связывают многие лиганды, правда, их «активные центры» константны и не имеют вариабельных зон. Связавшись с лигандами, они могут активировать комплемент по классическому пути, и этим также напоминают антитела. Наконец, пентраксины связываются с Fc $\gamma$ -рецепторами различных клеток, в том числе фагоцитов. Классическим является представление об опсонизации как о процессе связывания с частицей (например, с микробом) антител с последующей активацией комплемента, что повышает эффективность клиренса микробов благодаря усилению фагоцитоза за счет вовлечения в захват Fc-рецепторов, связывающихся с Fc-концами антител, и рецепторов комплемента. Но и пентраксины связываются со многими микроорганизмами, причем последствием связывания также является активация комплемента. Пентраксины, связавшись с микробом, используют тот же ассортимент рецепторов, что и «классические», Ig-содержащие иммунные комплексы, а именно Fc-рецепторы и рецепторы комплемента. Учитывая это многократно повторяющееся сходство функций пентраксинов и иммуноглобулинов, почти аналогию между ними, можно предполагать, что в доиммуноглобулиновый период эволюции пентраксины с их фиксированной лигандной специфичностью играли роль «протоантител» («предантител»), а Fc-рецепторы (равно как и рецепторы комплемента) – роль клеточных мембранных элементов, обеспечивающих взаимодействие пентраксинов (гуморальных факторов защиты) с клетками примитивного иммунитета. Помимо обеспечения элиминации микробных агентов Fc-рецепторы участвуют и в других процессах, как связанных с процессом фагоцитоза, так и не связанных с ним. Fc-рецепторы являются посредниками поглощения клетками иммунной системы и клетками эндотелия сосудов комплексов, содержащих модифицированные липопротеины и связавшиеся с ними аутоантитела или пентраксины (С-реактивный белок). Fc-рецепторы ответственны за индукцию быстрой секреции ряда цитокинов и ростовых факторов из фагоцитирующих клеток под влиянием активации IgG или С-реактивным белком, в том числе фактора, стимулирующего В-лимфоциты к продукции аутоантител (BLyS/BAFF). Таким образом, Fc-рецепторы являются древним элементом защиты, возникшим раньше иммуноглобулинов, и одна из их основных функций состояла (и состоит) в обеспечении «облегченного» фагоцитоза.

### **МЕТОДЫ ОЦЕНКИ ДЕТОКСИКАЦИИ ЛИПОПОЛИСАХАРИДА КОМПЛЕКСНОГО ВАКЦИННОГО ПРЕПАРАТА ДЛЯ ПРОФИЛАКТИКИ КОКЛЮША**

Назирова М.Р., Поддубиков А.В., Бажанова И.Г.

*НИИВС им. И.М. Мечникова РАМН, Москва, Россия*

**Введение.** Возможной причиной увеличения заболеваемости коклюшем является использование вакцин с ограниченным набором антигенов. В НИИВС им. И.И. Мечникова РАМН разработана оригинальная бесклеточная коклюшная вакцина, представляющая собой природный антигенный комплекс содержащий липополисахарид (ЛПС). Научные идеи и технологические решения, касающиеся антигенного состава разработанной вакцины, являются ступенью в разработке нового поколения бесклеточных коклюшных вакцин, по своим ха-

рактикам не уступающих корпускулярным вакцинным препаратам.

**Целью работы** является характеристика ЛПС *B. pertussis*, в том числе в составе вакцинных препаратов для профилактики коклюша.

**Материалы, методы и результаты.** Комплекс протективных антигенов *B. pertussis* был изучен в иммуноэлектрофорезе до и после детоксикации нагреванием и формалином. В качестве источника антител использовали коммерческую поливалентную диагностическую антисыворотку и полученную нами кроличью антисыворотку к ЛПС *B. pertussis*. Результаты исследования свидетельствуют об изменениях, происходящих в антигенной структуре препарата. Так, наблюдали исчезновение и/или смещение полос преципитации из области электронейтральных антигенов. Происходящее можно объяснить комплексобразованием – химической сшивкой и изменениями в антигенной структуре в результате воздействия формалина. Активность препарата в ЛАЛ-тесте, после детоксикации снижалась на 83% (табл.). В пользу механизма детоксикации ЛПС в результате комплексобразования свидетельствуют результаты, полученные при воспроизведении условий детоксикации для препаратов комплекса протективных антигенов и параллельной детоксикации препарата ЛПС *B. pertussis*. Исследование в ЛАЛ тесте указанных препаратов и контролей показало снижение активности только для комплексного препарата антигенов, тогда как активность препарата ЛПС не изменялась. Токсические свойства ЛПС *B. pertussis* были изучены при определении летального эффекта ЛПС на неинбредных мышах, обработанных актиномицином Д. Полученные результаты свидетельствуют о снижении токсичности вакцинного препарата в результате детоксикации по LD<sub>50</sub> в 22,5 раза. Токсичность по LD<sub>50</sub> полученных препаратов ЛПС *B. pertussis* была ниже токсичности препаратов *E. coli* в 1464 раза для препарата ЛПС шт. 475 и в 8097 раз для ЛПС шт. 162.

**Заключение.** Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о возможности снижения активности и детоксикации ЛПС *B. pertussis* формалином в составе комплексного вакцинного препарата для профилактики коклюша, определенных нами тремя различными способами (ЛАЛ-тест, иммуноэлектрофорез, биопроба с ак-

тиномицином Д). Введение в состав вакцинного препарата детоксицированного ЛПС, являющегося лигандом Toll-подобных рецепторов, активирующего врожденный и адаптивный иммунитет и обладающего выраженными адьювантными свойствами в отношении антигенов, входящих в состав вакцинного препарата.

## ФИБРОБЛАСТО-ЛИМФОЦИТАРНЫЕ РОЗЕТКИ

Никольский И.С., Никольская В.В.

*Институт генетической и регенеративной медицины НАМН Украины, г. Киев, Украина*

Становление и последующее формирование гемопоэтической системы осуществляется в тесной связи с мультипотентными стромальными клеточными (МСК) элементами мезенхимального происхождения. В костном мозге они представляют собой один из основных компонентов так называемых ниш – микроокружения гемопоэтических стволовых клеток, принимающего большое участие в процессах самоподдержания, дифференцировки и пролиферации последних, эффективная реализация которых рестриктирована по главному комплексу гистосовместимости (Sugiura K. et al., 2001). По-видимому, по крайней мере частично, такую важную роль костномозговые МСК играют благодаря способности к контактному взаимодействию с незрелыми клетками (Barda-Saad M. et al., 1996). Однако необходимость мезенхимального влияния становится очевидной и в качестве одного из решающих факторов лимфоидного развития. Так, показано, что происходящие из нейрального гребня тимусные МСК, совершенно необходимы для полноценной дифференцировки тимоцитов, а вследствие дефекта МСК тимуса у животных возникают нарушения весьма сходные с синдромом Ди Джорджи (Sunigara R.K. et al., 2000). Взаимодействие экспрессирующих фибронектин МСК тимуса с тимоцитами осуществляется, главным образом, благодаря высокой экспрессии на двойных негативных клетках VLA-4 (Sawada M. et al., 1992). Возможно, при этом происходят важные изменения дифференцировки тимоцитов, сходные с индуцируемыми тимусными эпителиальными клетками (Ярилин А.А., 2001).

Однако возможность и особенности контактного взаимодействия МСК тимуса с лимфоцитами и, в частности,

**ТАБЛИЦА. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ АКТИВНОСТИ И ОСТРОЙ ТОКСИЧНОСТИ ПРЕПАРАТОВ ЛПС *B. PERTUSSIS* (К ТЕЗИСАМ НАЗИРОВА М.Р. И ДР.)**

Препарат	Летальный эффект в биопробе с Актиномицином Д			Активность в ЛАЛ-тесте		
	LD <sub>50</sub>	LD <sub>84</sub>	LD <sub>100</sub>	Снижение токсичности	ЕЭ/мкг/мл	Снижение активности
ЛПС шт. 475	0,796	1,922	2,484	до детоксикации	1 950 000	в 1,005 раз
				после детоксикации	1 940 000	
ЛПС шт. 162	4,401	8,549	10,623	до детоксикации	2 400 000	в 1,017 раз
				после детоксикации	2 360 000	
Вакцинный препарат до детоксикации	1,120	2,197	2,736	в 22,6-24,1 раз	5 265±1880	в 4,7-6,5 раз
Вакцинный препарат после детоксикации	25,263	52,538	66,175		906±189	

с тимоцитами, остаются мало изученными и требуют проведения специальных исследований, тем более, что некоторые данные указывают на существенное значение контактных взаимодействий с участием МСК тимуса для повышения иммунобиологической активности клеток (Никольский И.С., 2010).

Культуру МСК получали на поверхности пластиковых 6-луночных планшетов, внося на них мелко измельченный тимус. Культивирование проводили в среде DMEM/F12 с 10% ЭТС и добавлением L-глутамина, HEPES-Na соли и антибиотиков. Среду заменяли каждые 3 дня. Чаще всего наблюдали рост клеток виде колоний непосредственно от эксплантатов, реже – от отдельной клетки. Колонии были представлены адгерентными фибробластоподобными клетками с типичной морфологией. Практически таким образом обнаруживалось довольно большое количество КОЕ-Ф.

При совместном культивировании *in vitro* тимусных МСК с сингенными тимоцитами мышей выяснилось, что часть тимоцитов обладает адгерентными по отношению к МСК свойствами. Модифицированием методики со смешиванием МСК и тимоцитов в суспензии с последующим осаждением обоих типов клеток и ресуспендированием обнаружено, что у тимоцитов и МСК имеется выраженное мембранное сродство, визуально проявляющееся формированием клеточных ассоциаций с центрально расположенной МСК, присоединившей несколько тимоцитов, наподобие хорошо известных фигур под названием розеток. Такие фибробласто-лимфоцитарные розетки (ФЛР) образовывали почти все МСК тимуса и только 30-40% этих клеток из костного мозга. Клетки лимфатических узлов мышей образовывали с МСК тимуса менее 20% ФЛР, что вместе взятое позволяет считать, что наиболее выраженным мембранным средством обладают тимусные МСК и тимоциты.

#### ИССЛЕДОВАНИЕ ВЛИЯНИЯ КОМПЛЕКСА ТАФТСИНА С КУКУРБИТ[7]УРИЛОМ НА ПРОДУКЦИЮ ИММУНОАКТИВНЫХ ЦИТОКИНОВ

Пашкина Е.А., Гришина Л.В., Щепотина Е.Г., Якушенко Е.В., Козлов В.А.  
НИИ клинической иммунологии СО РАМН,  
г. Новосибирск, Россия

**Введение.** Кукурбит[7]урил – это макроциклический наноразмерный кавитанд, построенный из шести гликолизурильных фрагментов, соединенных через метиленовые мостики и имеющий форму полого бочонка. Наличие внутренней полости позволяет кукурбит[7]урилу образовывать комплексы «гость-хозяин» с различными молекулами или ионами. Образование комплексов кукурбит[7]урила с лекарственными средствами предлагается применять для достижения различных преимуществ, в том числе для увеличения стабильности лекарственного средства и снижение коэффициента деградации *in vivo*. Известно, что известно, что образование комплексов пептидов с кукурбит[7]урилом препятствует гидролизу субстратов ферментами ЖКТ. В связи с этим для нас представляет интерес исследование комплексов кукурбит[7]урила с иммуномодулирующими пептидами, в частности с тафтсином.

**Цель:** исследовать влияние комплексообразования иммуномодулирующего пептида тафтсина с кукурбит[7]урилом на продукцию иммуноактивных цитокинов фактора некроза опухоли- $\alpha$  (TNF $\alpha$ ) и интерферона- $\gamma$  (IFN $\gamma$ ) мононуклеарами периферической крови (МНК ПК).

**Материалы и методы.** В качестве источника МНК ПК использовалась венозная кровь соматически здоро-

вых доноров. МНК ПК проводилось центрифугированием в градиенте плотности фикола. Мононуклеары ПК культивировались в стандартных условиях в среде RPMI-1640 с добавлением 10% FCS в течение 24 ч и 48 ч для исследования продукции TNF $\alpha$  (n = 6) и IFN $\gamma$  (n = 9) соответственно. В качестве контроля использовались супернатанты от интактных и стимулированных ЛПС, свободным пептидом и кукурбит[7]урилом мононуклеаров ПК. Концентрацию цитокинов оценивали используя тест-системы производства ЗАО «Вектор-Бест» (Россия).

**Результаты и обсуждение.** Нами было проведено сравнение продукции IFN $\gamma$  и TNF $\alpha$  при спонтанной индукции и при стимуляции комплексом и свободным пептидом. Между спонтанной продукцией TNF $\alpha$  и стимулированной комплексом, свободным пептидом и кукурбит[7]урилом достоверных различий обнаружить не удалось. Однако по IFN $\gamma$  было обнаружено, что присутствие комплекса повышалось в несколько раз уровень данного цитокина, в то время как добавление свободного пептида при культивировании не давало достоверных различий по сравнению со спонтанной индукцией. Из литературных источников известно, что в опытах *in vitro* на мононуклеарах периферической крови показано отсутствие эффекта при добавлении пептида и в то же время повышение уровня указанных цитокинов при стимуляции аналогами тафтсина, что связывают с более быстрой биодеградацией нативного пептида. Следовательно, полученный нами результат может свидетельствовать о защите от биодеградации пептида наноразмерным кавитандом кукурбит[7]урилом.

**Выводы.** Исходя из полученных результатов, дальнейшее исследование комплекса кукурбит[7]урила с тафтсином, а возможно и с другими иммуномодулирующими пептидами, является перспективным для разработки защиты от биодеградации и создания пероральных форм иммуномодулирующих пептидов.

#### ИММУНОФЕНОТИП И ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ АКТИВНОСТЬ ЛЕЙКОЦИТОВ МЫШЕЙ ПРИ ИММУНИЗАЦИИ ВАКЦИНОЙ ВАКСИГРИП В КОМБИНАЦИИ С ХИТОЗАНОМ

Переверзев А.Д., Ахматов Э.А., Сорокина Е.В., Маркушин С.Г., Сухно А.С., Хоменков В.Г., Ахматова Н.К.

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

В настоящее время для профилактики гриппа в подавляющем большинстве стран мира применяют инактивированные вакцины, формирующие преимущественно гуморальный иммунитет. Одной из зарекомендовавших себя противогриппозных инактивированных вакцин является высокоочищенная расщепленная вакцина Ваксигрип (Авентис Пастер, Франция). Она обладает низкой реактогенностью и высокой иммуногенностью, приводящей к индукции антител на защитном уровне ко всем трем компонентам вакцины. Учитывая данные свойства вакцины интерес представляет возможность использования Ваксигрипа с препаратом Хитозан (Россия), обладающим, как иммуномодулирующими, так и уникальными сорбционными свойствами.

**Целью работы** явилось изучение комбинированного действия вакцины Ваксигрип (0,2 мл) и препарата Хитозан (3 мкг) на клеточный иммунитет у мышей СВА при двукратном внутримышечном введении с интервалом в 4 недели. Цитотоксическую активность МЛ селезе-

нок против опухолевой линии клеток К-562 определяли в тесте восстановления 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолия бромид (МТТ-тест). Пролиферативную активность МЛ селезенки мышей проводили в колориметрическом тесте с использованием витального красителя AlamarBlue (Biosours, США). Оценку субпопуляционной структуры лимфоцитов осуществляли методом проточной цитометрии с применением моноклональных антител (МКА) (Caltag Laboratories, США) против клеточных антигенов.

При одновременном введении вакцины и хитозана в селезенках животных усиливалась цитотоксическая активность НК по отношению к НК-чувствительной линии клеток К562 (с  $18,5 \pm 1,3\%$  до  $68,7 \pm 4,2\%$ , при введении вакцины – до  $58,0 \pm 1,15\%$ ) и пролиферативная активность мононуклеарных лейкоцитов (с  $20,7 \pm 2,3\%$  до  $83,3 \pm 1,2\%$ , при введении вакцины – до  $33,8 \pm 2,3\%$ ), увеличивалось количество CD3 Т-лимфоцитов (с  $23 \pm 2,4\%$  до  $35,6 \pm 3,1\%$ ), НКТ-клеток (с  $2,03 \pm 0,2\%$  до  $5,15 \pm 0,8\%$ ), В-лимфоцитов (с  $25,06 \pm 2,6\%$  до  $49 \pm 3,6\%$ ). Вакцина при этом снижала численность CD3-клеток до  $13 \pm 2,3\%$ .

Сочетание Хитозана с вакцинацией корригировало содержание числа клеток, экспрессирующих МНС II, устраняя повышенную реактивность клеток иммунной системы под воздействием Ваксигрипа, а также повышалось содержание клеток, экспрессирующих МНС I, что указывает на усиление свойств клеток, распознающих внутриклеточные патогены, а, следовательно, активацию не только гуморального, но и клеточного иммунитета. В связи с этим, можно предположить, что дополнительное включение хитозана в вакцинацию Ваксигрипом позволяет корригировать переключение иммунного ответа с Th2- на Th1- путь.

#### **ДЕЙСТВИЕ ИНТЕРЛЕЙКИНА-4 НА УРОВЕНЬ ЦИТОКИНОВ В КРОВИ КРЫС С РАЗНЫМИ ХАРАКТЕРИСТИКАМИ ПОВЕДЕНИЯ ПРИ ЭМОЦИОНАЛЬНОЙ СТРЕССОРНОЙ НАГРУЗКЕ**

**Перцов С.С., Калиниченко Л.С., Коплик Е.В.**

*НИИ нормальной физиологии им. П.К. Анохина РАН, Москва, Россия*

Психоэмоциональный стресс сопровождается нарушениями иммунного статуса у млекопитающих (Корнева Е.А. с соавт., 1987; Godbout J.P., Glaser R., 2006). Это проявляется, в частности, в изменении цитокинового профиля биологических сред. Цитокины – полипептидные медиаторы межклеточных взаимодействий, регулирующие физиологические процессы как в норме, так и при патологических состояниях. Особое внимание исследователей привлекает противовоспалительный цитокин интерлейкин-4, особенностью которого является его регуляторное влияние как на клеточные, так и на гуморальные иммунные процессы (Кетлинский С.А., Симбирцев А.С., 2008).

В работах Судакова К.В. (1998) и Коплик Е.В. (2002) показаны выраженные индивидуальные различия резистентности крыс к негативным последствиям стрессорных нагрузок. Установлено, что поведенчески активные в тесте «открытое поле» животные более устойчивы к стрессорным воздействиям по сравнению с пассивными особями.

**Целью работы** было изучение действия интерлейкина-4 на цитокиновый профиль сыворотки крови у крыс с разными характеристиками поведения при эмоциональной стрессорной нагрузке.

Эксперименты проведены на 40 крысах самцах Вистар с активным и пассивным паттернами поведения в открытом поле. За 1 ч до стрессорной нагрузки животных внутрибрюшинно вводили интерлейкин-4 (5 мкг/кг) или физиологический раствор. Нестрессированные особи получали указанные инъекции за 2 часа до декапитации. В качестве модели стрессорной нагрузки использовали 1-ч иммобилизацию крыс с одновременным электрокожным раздражением подпороговой силы в стохастическом режиме. Концентрацию провоспалительного цитокина интерлейкина-1 $\beta$  и противовоспалительного интерлейкина-4 в сыворотке крови определяли иммуноферментным анализом.

Внутрибрюшинное введение интерлейкина-4 сопровождалось значительным повышением уровня этого цитокина в сыворотке крови крыс. Инъекция интерлейкина-4 не оказывала влияния на содержание интерлейкина-1 $\beta$  в крови нестрессированных животных.

После острой стрессорной нагрузки концентрация провоспалительного интерлейкина-1 $\beta$  снижалась в крови у поведенчески пассивных крыс, но увеличивалась у активных животных. У активных особей в этих условиях выявлено повышение уровня интерлейкина-4. Полученные данные отражают разнонаправленный характер иммунного ответа при стрессорной нагрузке у крыс с разными параметрами поведения. В этих условиях происходит подавление иммунных функций у предрасположенных к стрессу пассивных животных. Активация иммунных процессов, проявляющаяся в усилении продукции цитокинов, отмечена у прогностически устойчивых к стрессу активных особей в этих условиях.

Введение интерлейкина-4 предупреждает стрессогенные изменения концентрации провоспалительного цитокина интерлейкина-1 $\beta$  в крови животных. Известно, что интерлейкин-1 $\beta$  принимает участие в формировании гипоталамо-гипофизарно-надпочечникового ответа на стрессорное воздействие (Gadek-Michalska A. et al., 2008). Исходя из полученных данных можно предположить, что интерлейкин-4 нивелирует активацию гипоталамо-гипофизарно-надпочечникового комплекса при стрессе.

Результаты наших исследований показывают, что антагонистические взаимоотношения про- и противовоспалительных цитокинов не наблюдаются в обычных условиях, но ярко проявляются при патологических состояниях (в частности, в условиях стрессорной нагрузки). Подобные взаимоотношения между цитокинами играют важную роль в целостной организации иммунных реакций у млекопитающих.

#### **ОЦЕНКА ИММУНОМОДУЛИРУЮЩЕЙ АКТИВНОСТИ ЭХИНОХРОМА А ИЗ МОРСКОГО ЕЖА SCAPHECHINUS MIRABILIS**

**Попов А.М., Артюков А.А., Цыбульский А.В., Кривошапко О.Н.**

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

**Введение.** Изучено влияние пигмента морских ежей *Scaphechinus mirabilis* полигидроксиафтахинона эхинохрома А (ЭХА), который является действующей основой кардиопротекторного и офтальмологического препарата «Гистохром», на иммунную систему экспериментальных животных в дозах от 1 до 30 мг/кг.

**Материалы и методы.** Иммунологические показатели включали тесты оценки гуморального и клеточного иммунитета. В качестве стандартного тест-антигена приме-

няли эритроциты барана (ЭБ). Титры антител оценивали в реакции прямой гемагглютинации (РПГА) через 14 дней после однократной внутрибрюшинной (в/бр) иммунизации мышей ЭБ. Реакцию трансплантат против хозяина (РТПХ) применяли для оценки действия ЭХА на трансплантационный иммунитет. Влияние ЭХА на активность эффекторов воспаления клеточного типа оценивали по реакции гиперчувствительности замедленного типа (ГЗТ). Реакцию высвобождения медиаторов воспаления регистрировали при в/бр введении ЭХА и одновременном введении в лапку конканавалина А (Кон А). Исследование аллергенности ЭХА проводили путем его инъекции морским свинкам в подушечки лапок в дозах 1 и 10 мг/кг в смеси с полным адьювантом Фрейнда.

**Основные результаты.** ЭХА избирательно действует на гуморальное и клеточное звено иммунитета, в низких дозах (1 мг/кг и ниже) активируя гуморальный иммунитет, а в дозе 30 мг/кг незначительно подавляя клеточный иммунитет. По числу микроскопически видимых зон гемолиза ЭБ вокруг отдельных АОК установлено, что при введении препарата в дозе 1 мг/кг число АОК увеличилось на 77% по сравнению с контролем. Влияние ЭХА на ГЗТ было иммуносупрессивным: в дозе 10 мг/кг ЭХА подавлял клеточный иммунитет на 26%, а в дозе 1 мг/кг — на 19% от показателей контроля. Введение животным ЭХА оказывало стимулирующее влияние на развитие трансплантационного иммунитета: для доз ЭХА 1 мг/кг, 10 мг/кг и 30 мг/кг стимулирующий эффект (в %) относительно показателей контроля составил 175%, 112% и 75% соответственно. При изучении влияния ЭХА на высвобождение медиаторов воспаления все исследуемые дозы в случае его в/бр введения одновременно с подкожным введением Кон А приводили к снижению интенсивности местного воспаления в сравнении с контрольной группой животных. Показано отсутствие собственной иммуногенной и аллергенной активности ЭХА.

**Заключение.** Учитывая достаточно выраженную иммуномодулирующую активность ЭХА в дозе 1 мкг/кг, можно предположить перспективность продолжения работ по исследованию иммуотропной активности ЭХА в дозах меньших, чем 1 мг/кг. При условии проведения дополнительных исследований иммуномодулирующей и иммуноадьювантной активности ЭХА возможно расширение вариантов фармакологического использования данного нафтохинонового препарата путем его применения в иммунологической практике, а также — как вероятного иммунологического адьюванта при вакцинации.

#### **СТИМУЛИРУЮЩЕЕ ВЛИЯНИЕ ИНГИБИТОРА АКТИВНОСТИ ИНДОЛАМИН-2,3-ДИОКСИГЕНАЗЫ 1-МЕТИЛ-D-ТРИПТОФАНА НА РОСТ ИММУНОГЕННОЙ ОПУХОЛИ У МЫШЕЙ**

**Попова Н.А., Васильева Е.Д., Каледин В.И., Николин В.П.**

*Институт цитологии и генетики СОРАН,  
г. Новосибирск, Россия*

Фермент индоламин-2,3-диоксигеназа (ИДО), катаболизирующий триптофан по кинурениновому пути, создает его локальный дефицит при избытке токсичных для Т-лимфоцитов продуктов катаболизма. Таким образом ИДО ингибирует иммунный ответ. Поскольку ИДО экспрессируется во многих опухолях и макрофагах, инфильтрирующих опухоль, полагают, что активность этого фермента может играть роль в механизме регуляции роста

иммуногенных опухолей. Можно предположить, что синтезируя ИДО, иммуногенные опухоли избегают иммунную атаку со стороны организма. В представленной работе мы на модели заведомо иммуногенной опухоли гепатокарциноме Г-29 (Г-29) изучали влияние ингибитора активности ИДО 1-метил-D-триптофана на противоопухолевый иммунитет. Эта опухоль, возникшая у мыши линии СВА, прививается и у мышей линии СЗНА, однако у последних в ряде случаев прекращает рост и регрессирует. При введении ингибитора ИДО 1-метил-D-триптофана непосредственно в опухоль в течение 13 дней ежедневно в дозе 1 мг на мышью, мы вопреки ожидаемому получили не торможение роста опухоли, а стимуляцию. В результате продолжительность жизни подопытных животных была достоверно меньше, чем контрольных. Полученный парадоксальный на первый взгляд результат может быть объяснен сложностью механизмов патологической иммунной привилегии, в которых развивается опухоль. В этих условиях стимуляция иммунитета может привести не к торможению, а к стимуляции опухолевого роста.

#### **ПОЛУЧЕНИЕ КОЛЛЕКЦИИ МОНОКЛОНАЛЬНЫХ АНТИТЕЛ К АФП**

**Порываева В.А., Агафонова О.А., Шевченко Ю.А., Решетников С.С., Гришаев М.П.**

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

Количественное определение альфафетопротеина (АФП) в современной диагностике может быть использовано для мониторинга состояния плода во время беременности и для диагностики некоторых форм раковых заболеваний. АФП представляет собой гликозилированный белок, причем гликозидная часть имеет непостоянную структуру и состав. Раковый и эмбриональный белки имеют одинаковую белковую основу, но разные гликозидные части.

**Целью работы** было получение моноклональных антител (МоАТ) к АФП с задачей дальнейшего использования их для диагностических целей.

**Материалы и методы.** Для получения гибридом мышей линии BALB/c иммунизировали двумя препаратами АФП природного происхождения: раковым (АФП<sub>р</sub>) и эмбриональным (АФП<sub>э</sub>). Спленоциты иммунизированных мышей сливали с клетками мышиной миеломы NS1. Исследование наличия целевых антител к АФП<sub>р</sub> и АФП<sub>э</sub> проводили в непрямом твердофазном ИФА. Гибридомы клонировали методом предельных разведений. Эпитопное картирование проводили с использованием конкурентного ИФА.

**Результаты и обсуждение.** В результате получено 187 первичных культур гибридом с синтезом целевых антител. Из них 12 культур гибридом получили от мышей, иммунизированных раковым антигеном, а остальные 175 — от мышей, иммунизированных эмбриональным антигеном. Первичный скрининг антителопродукции полученных гибридом проводили по реакции культуральных супернатантов с раковым и эмбриональным АФП в непрямом ИФА. Дальнейшее титрование культуральных супернатантов с АФП<sub>э</sub> и АФП<sub>р</sub> показало, что многие АТ одинаково реагировали как с раковым, так и с эмбриональным АФП. Антитела 20% гибридом предпочитали АФП эмбриональный как по соотношению титров, так и по соотношению сигналов. Не было АТ, предпочитающих раковый АФП, а также таких, которые реагировали толь-

ко с одним из 2-х АФП. Известно, что АФП имеет очень высокую степень гомологии с рядом белков, в частности с ЧСА. Нами показано, что перекрестную реакцию с ЧСА имели антитела только 5 гибридных культур.

10 гибридом были отклонены до однородности свойств субклонов по продукции антител, для них получены асцитные препараты, антитела очищены и синтезированы пероксидазные конъюгаты моноклональных антител. С помощью полученных нами конъюгатов методом твердофазного конкурентного ИФА на сегодняшний день нами выявлено 4 неперекрывающихся антигенных участка как на молекуле АФПэ, так и аналогично на АФПр. Антитела мажорной группы конкуренции, связывающие эпитоп для МоАТ 36Аб, присутствуют в культуральных супернатантах 36% гибридом нашей коллекции, антитела для каждого из других 3-х эпитопов – в менее чем 17%. Используя препараты очищенных МоАТ для сорбции в лунки полистироловых планшетов и пероксидазные конъюгаты МоАТ из разных групп конкуренции мы получили пилотные варианты тест-систем для выявления АФПр и АФПэ в «сэндвич»-варианте ИФА.

### ИНДУКЦИЯ ГУМОРАЛЬНОГО ОТВЕТА К АУТОАНТИГЕНУ С ПОМОЩЬЮ В-ЭПИТОПА АУТОАНТИГЕНА И Т-ЭПИТОПА ЧУЖЕРОДНОГО АНТИГЕНА

Прохоров А.В.<sup>1</sup>, Зубарева А.А., Свищевская Е.В.

*ИБХ РАН, Москва, Россия*

<sup>1</sup> *Центр «Биоинженерия» РАН, Москва, Россия*

Для изучения патогенеза аутоиммунных заболеваний в ряде случаев требуется получение антител у опытных животных к собственным антигенам. Поскольку ответ на собственные антигены находится под контролем центральной и периферической толерантности, то зачастую бывает невозможно смоделировать аутоиммунный процесс.

**Целью** данной работы была проверка гипотезы индукции антител к собственному белку десмоглеину 3 (ДСГ3) с помощью пептидной конструкции, состоящей из В-эпитопа ДСГ3 и Т-эпитопа чужеродного белка. Мы использовали три пептида из вируса гриппа штамма H1N1. Для эффективного распознавания В-эпитопов требуется физическая связь между Т- и В-эпитопами. С этой целью использовали либо линкер из низкомолекулярного хитозана, либо наночастицы гексаноилхитозана, на которые сорбировали Т- и В-эпитопы. Мышей линии BALB/c иммунизировали внутрибрюшинно смесью пептидов; конъюгатами пептидов или сорбированными на наночастицах пептидами. Иммунизацию повторяли через неделю. Кровь на анализ забирали через 5 дней после второй иммунизации. Наличие антител к В-эпитопу ДСГ3 определяли с помощью пептидного иммуно-ферментного анализа. Показали, что введение смеси пептидов не вызывает гуморального ответа на В-пептид ДСГ3, также как и на Т-пептиды белков вируса гриппа. Иммунизация конъюгатом Т-В пептидов на хитозановом линкере вызвала выраженный гуморальный ответ на В-эпитоп. Иммунизация пептидами, сорбированными на наночастицах также вызывала иммунный ответ, хотя и менее выраженный. Таким образом, мы показали, что для индукции ответа на аутоантиген можно использовать В-эпитоп из этого антигена и универсальный Т-эпитоп из чужеродного антигена, например из белков вируса гриппа.

Работа поддержана ФЦП «Научные и педагогические кадры инновационной России на 2009-2013 годы», Госконтракт № 14.740.11.0454.

### ИЗУЧЕНИЕ ВЛИЯНИЯ МЕСТНОГО ПРИМЕНЕНИЯ РЕКОМБИНАНТНОГО ИНТЕРЛЕЙКИНА-1 $\beta$ НА ПРОЦЕССЫ ВОСПАЛЕНИЯ, РЕПАРАЦИИ И ИНФИЛЬТРАЦИИ ЛЕЙКОЦИТАМИ СЛИЗИСТОЙ ОБОЛОЧКИ ЖЕЛУДКА КРЫС

Сазонова Т.А., Варюшина Е.А., Александров Г.В., Симбирцев А.С.

*ФГУП «Гос. НИИ ОЧБ» ФМБА России, Санкт-Петербург, Россия*

**Введение.** Заживление повреждений слизистой оболочки желудка (СОЖ) регулируется многими факторами, центральную роль в нем играют цитокины. Интерлейкин-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) является одним из ключевых цитокиновых медиаторов иммунного ответа с широкой биологической активностью. Мишенями IL-1 $\beta$  являются практически все типы клеток. Известно, что IL-1 $\beta$  играет важную роль в процессах репарации. Местное применение рекомбинантного IL-1 $\beta$  способно стимулировать репаративные процессы, при этом позволяет избежать многих побочных эффектов, которые могут возникать при системном применении.

**Цель.** Целью нашей работы было изучение местного влияния рекомбинантного IL-1 $\beta$  человека на процессы репарации слизистой оболочки желудка (СОЖ) у крыс и инфильтрацию ее лейкоцитами (макрофагами и нейтрофилами) в очаге поражения.

**Материалы и методы.** Была использована модель хронического поражения СОЖ, индуцированного аппликацией уксусной кислоты, а также модель острого поражения СОЖ, индуцированного внутрижелудочным введением 96% этанола. Контрольные группы получали содовый раствор без IL-1 $\beta$ . Опытным группам вводили рекомбинантный IL-1 $\beta$  в 4% содовом растворе внутрижелудочно с помощью зонда. Проводилось планиметрическое, гистологическое и гистохимическое исследование.

**Результаты.** Вначале нами была изучена модель хронического поражения. Результаты планиметрического и гистохимического исследования показали, что трехкратное введение IL-1 $\beta$  с 3 по 5-й день эксперимента в дозе 100 нг/мл позволяло добиться максимального снижения площади поражения СОЖ, а также достоверного увеличения как общего числа нейтрофильных гранулоцитов, так и количества активных нейтрофилов в подслизистой основе СОЖ. При изучении модели спиртового поражения, было показано, что максимальные поражения и инфильтрация СОЖ нейтрофилами происходит на сроке 24 часа, максимальное количество макрофагов наблюдалось на сроке 72 часа. В экспериментах с IL-1 $\beta$ , препарат вводили через два часа после введения спирта. Применение IL-1 $\beta$  в дозе 50 нг/мл и 5 мкг/мл достоверно уменьшало площадь поражения СОЖ на сроке наблюдения 24 часа. Гистохимическое исследование показало, что IL-1 $\beta$  в дозе 5 мкг/мл достоверно увеличивал инфильтрацию СОЖ макрофагами на данном сроке.

**Заключение.** Таким образом, при внутрижелудочном введении IL-1 $\beta$  может снижать поражения СОЖ в двух изученных моделях, и влиять на лейкоциты в очаге поражения.

### ЭКСПРЕССИЯ ГЕНОВ НЕКОТОРЫХ ЦИТОКИНОВ В ГОЛОВНОМ МОЗГЕ МЫШЕЙ ПРИ ИНФЕКЦИИ ВИРУСОМ КЛЕЩЕВОГО ЭНЦЕФАЛИТА

Саличев А.В., Гришина К.Г., Санин А.В.<sup>1</sup>,  
Пронин А.В.<sup>1</sup>, Наровлянский А.Н.<sup>1</sup>, Ожерелков С.В.

*Институт полиомиелита и вирусных энцефалитов  
им. М.П. Чумакова РАМН, Москва, Россия  
<sup>1</sup> ФГБУ НИИЭМ им. Н.Ф. Гамалеи  
Минздравсоцразвития РФ, Москва, Россия*

Исторически вирус клещевого энцефалита (ВКЭ) был отнесен к нейротропным возбудителям инфекции. На основании имеющихся на сегодняшний день литературных данных (Леонова Г.Н., 2009) можно утверждать, что у данного вируса имеется тропность прежде всего к лимфоидным клеткам. Коррекция иммунного ответа при инфекции ВКЭ может существенно облегчить её течение. Одним из препаратов, обладающих как притововирусным, так и иммуномодулирующим свойством, является Фоспренил™ (ФП), содержащий полипренилфосфат натрия. ФП проявляет противовирусную активность в отношении целого ряда вирусов (среди которых ВКЭ, вирус простого герпеса 1-го типа и др.). В то же время особенности защитного действия ФП в непосредственном очаге воспаления – головном мозге, не изучены.

**Целью** данной работы являлось изучение влияния препарата ФП на течение инфекции ВКЭ и индукцию цитокинов (ЦТ) в головном мозге мышей при интрацеребральном (ИЦ) введении вируса и препарата.

В ходе работы выявлено, что при ИЦ заражении мышей линии Valb/c массой 12-14 г ВКЭ и одновременном введении ФП в дозе 60 мкг/мышь наблюдается существенное снижение летальности животных по сравнению с группами, зараженными той же дозой вируса, но без введения ФП. Наблюдалось снижение летальности с 67% в группе животных, инфицированных ВКЭ, до 9% в группе мышей, которым одновременно вводили ФП и ВКЭ. При ИЦ заражении мышей ВКЭ в более низкой дозе, регистрировалась гибель 27% животных, а при совместном введении ФП и ВКЭ мыши выживали в 100% случа-

ев. Было отмечено, что у большинства животных, зараженных ВКЭ, проявлялась выраженная неврологическая симптоматика инфекции (парезы или параличи задних конечностей) с последующей гибелью. При заражении животных ВКЭ и совместном введении ФП случаев неврологической симптоматики отмечено не было. Можно предположить, что наблюдаемая высокая степень защиты мышей препаратом ФП обусловлена его иммуномодулирующим действием и влиянием на выработку различных ЦТ в очаге инфекционного поражения ткани головного мозга. Для проверки данной гипотезы, а также для изучения механизмов иммунопатогенеза ВКЭ-инфекции было проведено определение уровней экспрессии генов различных ЦТ (IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-4, IL-6, IL-10, IL-12 $\alpha$ , IL-12 $\beta$ , IL-15, IL-18, IL-23, IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$ ), поверхностных клеточных маркеров – CD4 и CD25 и транскрипционного фактора NF- $\kappa$ B в ткани головного мозга мышей. В исследование вошли группы с наличием (на 5-9 сутки после заражения) и отсутствием (на 15-е сутки после заражения) неврологической симптоматики. В группе животных с параличами задних конечностей было зарегистрировано значительное повышение экспрессии ряда ЦТ (см. табл.). Контролем послужили животные, которым вводили ИЦ 0,03 мл среды 199. Уровни экспрессии на 5-е и 9-е сутки после заражения, помеченные звездочкой (\*), достоверно отличаются друг от друга. Транскрипты генов TNF $\alpha$  и IL-10 в контроле не обнаруживались, поэтому их минимальное значение (в группе на 5-е сутки после заражения) принято за 1. Уровни экспрессии генов IL-12 $\alpha$ , IL-18, IL-23 и CD4 не отличались от контрольных значений. Отмечено, что транскрипт гена IL-4 определялся у всех контрольных животных, при этом у животных с неврологической симптоматикой КЭ он присутствовал только у 2 из 6-ти особей. Значения экспрессии исследуемых генов у выживших мышей не отличались от контрольных.

Таким образом, показано, что неврологическая симптоматика ВКЭ-инфекции ассоциирована с целым каскадом увеличения экспрессии генов различных иммунорегуляторных молекул в головном мозге, что является как отражением остропротекающего КЭ, так и, вероятно,

**ТАБЛИЦА. УВЕЛИЧЕНИЕ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ ЦТ В ГОЛОВНОМ МОЗГЕ МЫШЕЙ С НЕВРОЛОГИЧЕСКОЙ СИМПТОМАТИКОЙ НА 5-Е И 9-Е СУТКИ ПОСЛЕ ИЦ ВВЕДЕНИЯ ВКЭ ПО СРАВНЕНИЮ С КОНТРОЛЕМ (p < 0,05) (К ТЕЗИСАМ САЛИЧЕВА А.В. И ДР.)**

	5-е сутки после заражения	9-е сутки после заражения
IL-1 $\alpha$	6,14	10,55
IL-1 $\beta$	12,43	28,1
IL-6	116,54	1260,32
IL-10	1*	87,8*
IL-12b	1975,42	7974
IL-15	4,8	20,71
IFN $\gamma$	9,26*	1234,5*
TNF $\alpha$	1*	10,5*
NF- $\kappa$ B	6	5
CD25	27,85*	458,47*

дополнительным патогенетическим фактором инфекционного процесса.

### **ВЛИЯНИЕ СТРОМАЛЬНЫХ КЛЕТОК ЖИРОВОЙ ТКАНИ (СКЖТ) НА ПРОЛИФЕРАЦИЮ И ПРОДУКЦИЮ ИММУНОГЛОБУЛИНОВ (Ig) КУЛЬТИВИРУЕМЫМИ В-КЛЕТОЧНЫМИ ЛИНИЯМИ**

Самойлович М.П., Шашкова О.А., Вартамян Н.Л., Пиневиц А.А., Руденко И.Я., Климович В.Б.

ФГУ РНЦ радиологии и хирургических технологий, Санкт-Петербург, Россия

Сведения о влиянии СКЖТ на функции В-лимфоцитов противоречивы, что может быть обусловлено различиями в способах тестирования, а также неодинаковой степенью зрелости исследуемых клеток. Культивируемые В-клеточные линии представляют собой однородные популяции трансформированных клеток, блокированных на разных стадиях дифференцировки. Лимфобластоидные клетки линии Namalva соответствуют стадии незрелых В-лимфоцитов. Они синтезируют небольшие количества IgM лямбда-типа. Клетки линии U266 по уровню дифференцировки соответствуют стадии плазмбластов и являются сильными продуцентами IgE- лямбда-типа.

**Задача работы** состояла в изучении влияния СКЖТ на пролиферацию клеток указанных линий и продукцию ими молекул Ig.

Клеточные линии Namalva и U266 были получены из Российской коллекции клеточных культур ИЦ РАН. Источником СКЖТ служила подкожная жировая ткань пациентов, удаленная в ходе выполнения плановых хирургических операций. Ткань измельчали, диссоциировали с помощью коллагеназы и помещали в культуральные флаконы. Неприлипающие к пластику клетки удаляли через 24 часа. СКЖТ культивировали в среде DMEM-F12 с 10% эмбриональной телячьей сыворотки в атмосфере с 5% CO<sub>2</sub>. Фенотипирование с помощью проточной цитометрии выявило набор характерных для СКЖТ маркеров. Для сокультивирования с В-клеточными линиями СКЖТ засеивали в планшеты из расчета 5000 клеток на см<sup>2</sup>, через сутки в те же ячейки рассевали лимфоидные клетки в концентрациях от 500 до 100 000 клеток в мл. В ряде экспериментов вместо СКЖТ использовали среду, кондиционированную этими клетками. На 5 сутки после посева собирали клеточные суспензии и в них определяли концентрацию клеток. С помощью проточной цитометрии оценивали состав клеточных популяций по содержанию цитоплазматического Ig. Методом ИФА исследовали концентрацию Ig в среде культивирования.

Установлено, что клетки Namalva и U266 могут выживать и пролиферировать только при расसेве в высоких концентрациях (5000 и 2000 клеток в мл, соответственно). Сокультивирование этих клеток с СКЖТ способствовало их выживанию и стимулировало пролиферацию даже при самых низких посевных концентрациях. Эффект поддержания жизнеспособности и стимуляции пролиферации был наиболее выражен при культивировании в условиях дефицита сывороточных ростовых факторов. Среда, кондиционированная СКЖТ, частично воспроизводила эффект присутствия СКЖТ, т.к. стимулировала пролиферацию только после достижения критической концентрации лимфоидных клеток. При сокультивировании клеток Namalva с СКЖТ отмечено 3-10-кратное снижение продукции IgM. Присутствие СКЖТ при культиви-

ровании клеток U266 не влияло на внутриклеточное содержание и секрецию IgE. Выявленные особенности двух линий по продукции Ig, вероятно, связаны с различиями в распределении синтетической и секреторной активности на протяжении клеточного цикла.

Таким образом СКЖТ при сокультивировании с клетками двух трансформированных В-клеточных линий, различающихся по стадии дифференцировки, способствовали их выживанию и пролиферации.

### **ЭКСПРЕССИЯ ГЕНОВ ЦИТОКИНОВ ПРИ ЭТАНОЛОВОМ И СТРЕССОРНОМ ПОВРЕЖДЕНИЯХ ЖЕЛУДКА У КРЫС РАЗНЫХ ЛИНИЙ**

Сангаджиева А.Д.<sup>1</sup>, Бакаева З.В.<sup>1</sup>, Самонина Г.Е.<sup>1</sup>, Шаповал И.М.<sup>2</sup>, Осипова В.А.<sup>2</sup>, Мезенцева М.В.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Московский Государственный Университет им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

<sup>2</sup>ФГБУ НИИЭМ им. Н.Ф. Гамалеи Минздрава России, Москва, Россия

Глипролины (ГП) — эти короткие пептиды, обладающие широким спектром биологических активностей, являются эндогенными регуляторами. Они образуются в процессе синтеза и деградации коллагена и других белков соединительнотканного матрикса. К данному семейству относятся простейшие ди- и трипептиды Pro-Gly-Pro (PGP), Pro-Gly (PG), Gly-Pro (GP) и другие. На разных моделях язвообразования, отражающих различные аспекты ulcerogenesis, были показаны протекторные и лечебные свойства многих глипролинов.

**Целью** данной работы являлось изучение влияния Pro-Gly-Pro (PGP) на экспрессию генов основных регуляторных цитокинов при этаноловом и стрессорном язвообразовании у крыс, используемых для экспериментальных исследований.

**Материалы и методы.** Эксперименты проводили на самцах белых беспородных крыс (этаноловая модель) и самцах крыс линии Вистар (стрессорная модель). Животным опытных групп за час до проведения эксперимента интраназально вводили короткий пептид PGP, разработанный в Институте Молекулярной генетики РАН, в дозе 3,7 мкг/кг в объеме 10 мкл/200 г, контрольной группе — физиологический раствор в том же объеме. Этаноловые повреждения слизистой оболочки желудка (СОЖ) вызывали внутрижелудочным введением 96°-го этанола (1 мл/200 г веса). Стресс вызывали 30-минутным плаванием в «холодной воде» при температуре 21 °С. Площадь язвенных повреждений СОЖ (мм<sup>2</sup>) рассчитывали с помощью бинокулярной лупы с окуляр-микрометром. Статистическую обработку результатов рассчитывали по критерию Стьюдента и Манна-Уитни. Для определения активности мРНК 11 цитокинов в мононуклеарах периферической крови использовали методы обратной транскрипции и полимеразной цепной реакции.

**Результаты.** Выявлено, что экспрессия генов интерферона IFN $\alpha$  и IFN $\gamma$  происходит на одном и том же уровне у крыс разных линий, причем, в 10-20% случаев у беспородных крыс чаще наблюдается активная транскрипция интерлейкина IL-1 $\beta$ , IL-12, IL-17 и реже — IL-2, IL-10 и IL-18. Статистически значимые отличия были получены по следующим показателям: у крыс линии Вистар достоверно чаще регистрируется мРНК IL-6, а у беспородных крыс чаще выявляется мРНК противовоспалительного цитокина IL-4 и провоспалительных — IL-8, TNF $\alpha$ .

Можно предположить, что у беспородных крыс выше функциональная активность Th2 (ориентируясь на активную экспрессию гена IL-4) и моноцитов/макрофагов (IL-1 $\beta$ , IL-12, IL-8, TNF $\alpha$ ), чем у крыс линии Вистар, у которых активнее экспрессируются гены цитокинов, синтезируемые Th1 лимфоцитами (IL-2), Treg (IL-10) и также макрофагами (IL-6, IL-18).

Через час после введения PGP (3,7 мкмоль/кг, интраназально) у крыс линии Вистар выявлена тенденция к активации транскрипции цитокинов, участвующих в антигенном ответе IL-4 (статистически достоверно) и IL-10, а также – IL-8 и IL-18. У беспородных крыс применение PGP вызвало угнетение транскрипции IFN $\alpha$ , IL-6, IL-8, IL-10, IL-17, TNF $\alpha$ . Изменение уровня транскрипции цитокинов у крыс под влиянием PGP, вероятно, связано с тем, что этот глипролиновый трипептид относится к регуляторным пептидам.

Этанол и стресс вызывали повреждения СОЖ, площадь которых в среднем составила 144,46 мм<sup>2</sup> и 0,88 мм<sup>2</sup> соответственно. Противовоспалительный эффект (ПЭ) PGP на этаноловой и стрессорной моделях язвобразования был равен 52% и 76% соответственно. Внутрижелудочное введение этанола сопровождалось активацией экспрессии генов IFN $\gamma$ , IL-6, IL-8, IL-17 и подавлением транскрипции IL-12. На фоне PGP этаноловые повреждения сопровождались достоверным понижением транскрипции IL-12. Также наблюдалась тенденция к угнетению транскрипции IFN $\gamma$ . Стресс повышал экспрессию противовоспалительного цитокина IL-4 ( $p < 0,05$ ), IL-12, угнетал экспрессию – IL-1 $\beta$ , IL-18. При этом введение PGP способствовало активации транскрипции IL-4 и угнетению экспрессии гена IL-6.

**Заключение.** Проведенные исследования позволили выявить закономерности экспрессии генов цитокинов у крыс в норме и при язвобразовании на разных экспериментальных моделях. Сделана попытка провести контролируемое лечение язвобразования у крыс с помощью короткого пептида.

Работа выполнена при поддержке РФФИ. Грант № 09-04-00669-а.

### ФОСФОРИЛИРОВАННЫЕ ПОЛИИЗОПРЕНОИДЫ РАСТИТЕЛЬНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ ПРОЯВЛЯЮТ ПРОТИВОВОСПАЛИТЕЛЬНУЮ АКТИВНОСТЬ

Санин А.В.<sup>1</sup>, Наровлянский А.Н.<sup>1</sup>, Пронин А.В.<sup>1</sup>, Ганшина И.В.<sup>1</sup>, Кожевникова Т.Н.<sup>1</sup>, Тимофеева Т.Ю.<sup>1</sup>, Санина В.Ю.<sup>1</sup>, Суханова С.А.<sup>2</sup>, Проскурина О.В.<sup>2</sup>, Митрохин Н.М.<sup>2</sup>

<sup>1</sup> ФГБУ НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф. Гамалеи Минздравсоцразвития РФ, Москва, Россия

<sup>2</sup> ОАО «ВНЦ БАВ», г. Старая Купавна, Московская обл., Россия

**Введение.** Фосфорилированные полиизопrenoиды (ФП) растительного происхождения, в частности Фоспренил и Гамапрен, обладают высокой противовирусной активностью, которая связана как с прямым действием на вирусные частицы, так и опосредована через воздействие на иммунную систему. Поскольку одним из важных компонентов противовирусного иммунитета является воспалительная реакция, было начато исследование возможных противовоспалительных свойств ФП в различных тест-системах. В частности, была продемон-

стрирована способность ФП оказывать выраженное ингибирующее воздействие на активность 5-липоксигеназы (катализирует первые два шага метаболизма арахидоновой кислоты в лейкотриены) и 15-липоксигеназы (в результате последовательного действия двух липоксигеназ – 15-ЛППГ и 5-ЛППГ – из арахидоновой кислоты образуются липоксины, регулирующие клеточные реакции воспаления).

**Целью** данной работы было изучение возможного противовоспалительного действия ФП на моделях отека лапы крыс, индуцированного каррагинаном или полным адьювантом Фрейндта (ПАФ).

**Материалы и методы.** В качестве источника ФП использовали препарат Фоспренил производства ЗАО «Микро-плюс», содержащий 4 мг полипренилфосфата натрия в 1 мл.

1. Модель каррагинан–индуцированного отека лапы крыс. В правую лапу крысы субплантарно вводили 1% раствор каррагинана в объеме 0,1 мл. ФП в дозах 2, 4, 10 мг/кг вводили внутрибрюшинно за 30 мин до введения каррагинана, препарат сравнения индометацин в дозе 10 мг/кг применяли внутрижелудочно за 60 мин до инъекции каррагинана. Измерение объема лап проводили с помощью цифрового водяного плетизмометра (Ugo Basel) через 4 часа после введения каррагинана. Терапевтическое воздействие вещества оценивали по степени угнетения воспалительной реакции в сравнении с интактной левой лапой данного животного и реакцией лап крыс контрольной группы.

2. Модель ПАФ-индуцированного отека лапы крыс. ПАФ вводили субплантарно в правую лапу крысы в объеме 0,1 мл. ФП в дозах 2, 4, и 10 мг/кг вводили в/б за 30 мин до введения ПАФ и через 1 час после введения. Препарат сравнения индометацин в дозе 10 мг/кг применяли внутрижелудочно за 1 час до введения ПАФ и через 1 час после введения.

**Результаты.** Установлено, что ФП на модели каррагинан–индуцированного отека оказывает противовоспалительное действие, хотя и более слабое, чем индометацин. В дозе 2 мг/кг ФП ингибирует отек лапы на 22,8%, а в дозе 10 мг/кг – на 34,5%.

На модели ПАФ-индуцированного отека ФП проявил слабовыраженный противовоспалительный эффект. Ингибирование отека в дозе 2 мг/кг составляло 17,1%, в дозе 4 мг/кг – 19,8 и в дозе 10 мг/кг – 11,5%.

**Заключение.** Таким образом, при изучении противовоспалительного действия ФП на моделях каррагинан- и ПАФ-индуцированных отеков лапы крысы у ФП обнаружены противовоспалительные свойства. Учитывая ранее полученные данные о наличии ингибирующего воздействия ФП на активность 5-липоксигеназы и 15-липоксигеназы, мы заключаем, что ФП обладает противовоспалительной активностью, которая проявляется по-разному в различных тест-системах.

### ИЗМЕНЕНИЯ МИГРАЦИОННОЙ АКТИВНОСТИ МОНОЦИТОПОДОБНЫХ КЛЕТОК ЛИНИИ THP-1 ПОД ВЛИЯНИЕМ КОМПОНЕНТОВ STREPTOCOCCUS PYOGENES M22.

Старикова Э.А., Бузова Л.А., Фрейдлин И.С.  
НИИ экспериментальной медицины СЗО РАМН,  
Санкт-Петербург, Россия

**Введение.** В участке воспаления в ходе развития инфекционного процесса накапливаются продукты дегра-

дации бактериальных клеток. Мишенями действия компонентов бактерий становятся эндотелий сосудов и мигрирующие в очаг инфекции лейкоциты.

**Целью** данного исследования было сравнительное изучение влияния компонентов *S. pyogenes* на хемотаксис и трансэндотелиальную миграцию (ТЭМ) моноцитоподобных клеток.

**Материалы и методы.** В работе использовался супернатант разрушенных ультразвуком *S. pyogenes* тип М22, стерилизованный фильтрацией («лизат стрептококка»). Моноцитоподобные клетки перевиваемой линии ТНР-1 и эндотелиальные линии EA.hy926 культивировали в среде с необходимыми добавками, при 37 °С во влажной атмосфере с 5% CO<sub>2</sub>. Экспрессию поверхностных молекул после 4-часовой инкубации с «лизатом стрептококка» оценивали с использованием моноклональных антител, методом проточной цитометрии. Миграцию (хемотаксис) клеток ТНР-1 изучали в трансвеллах с диаметром пор 8 мкм (экспозиция 2 ч), трансэндотелиальную миграцию (ТЭМ) клеток ТНР-1 оценивали в таких же трансвеллах с преформированным конфлюэнтным монослоем эндотелиальных клеток (экспозиция 3 ч). Для оценки интенсивности миграции и трансмиграции в содержимом нижних камер подсчитывали количество клеток ТНР-1. В некоторых случаях проводили суточную преинкубацию клеток с «лизатом стрептококка».

**Результаты.** «Лизат стрептококка», помещенный в нижнюю камеру трансвелл, проявлял высокую, статистически достоверную и дозозависимую активность хемотактанта для клеток ТНР-1. Интенсивность миграции клеток ТНР-1 при наличии лизата только в верхней камере достоверно не отличалась от уровня спонтанной миграции. Интенсивность миграции клеток ТНР-1 в случае присутствия лизата и в верхней и в нижней камерах была достоверно ниже, чем интенсивность миграции этих клеток в случае присутствия лизата только в нижней камере, хотя была в 7 раз выше соответствующего спонтанного уровня. Интенсивность ТЭМ в присутствии лизата в нижней камере трансвелл была в 2,7 раза выше, чем спонтанная ТЭМ. Для уточнения точек приложения действия «лизата стрептококка» проводили преинкубацию эндотелиальных клеток или клеток ТНР-1 в присутствии «лизата стрептококка». Суточная преинкубация клеток ТНР-1 в присутствии лизата приводила к полной ингибции их миграции и трансмиграции. В то же время, суточная преинкубация ЭК в присутствии лизата не влияла на интенсивность трансмиграции. После инкубации клеток ТНР-1 в присутствии «лизата стрептококка» в течение 4 часов уровни экспрессии адгезионных молекул CD49d, CD99, CD31 повышались незначительно, а уровень экспрессии CD11b снижался. После инкубации эндотелиальных клеток в присутствии «лизата стрептококка» уровни экспрессии лигандов для этих молекул на эндотелиальных клетках несколько снижались. Таким образом, стимулирующее миграционную активность клеток ТНР-1 действие «лизата стрептококка» не было связано с изменениями уровней экспрессии адгезионных молекул. Однако преинкубация клеток ТНР-1 или эндотелиальных клеток в присутствии блокирующих антител против адгезионной молекулы CD99 приводила к полной ингибции спонтанной ТЭМ и снижению интенсивности индуцированной «лизатом стрептококка» ТЭМ до уровня спонтанной (в 3 раза). Оба эффекта были статистически достоверны.

**Заключение.** Полученные данные говорят в пользу участия адгезионных молекул CD99 в регуляции спон-

танной и индуцированной «лизатом стрептококка» ТЭМ клеток ТНР-1. Компоненты лизата стрептококка в зависимости от срока инкубации разнонаправленно влияют на миграционную активность клеток ТНР-1. Повышение интенсивности ТЭМ в присутствии лизата, в основном связано с активностью трансмигрирующих клеток.

### ЦИТОТОКСИЧЕСКОЕ ДЕЙСТВИЕ ШТАММОВ СТРЕПТОКОККОВ ГРУППЫ А СЕРОТИПА М49 НА ГЕПАТОМУ 22а У МЫШЕЙ

Суворова М.А., Потатуева О.О., Киселева Е.П.

НИИЭМ СЗО РАМН, Санкт-Петербург, Россия

Поиск альтернативных подходов к терапии онкологических заболеваний — одна из важнейших задач современной иммунотерапии. Механизмы, приводящие к регрессии опухолей при применении продуктов жизнедеятельности микроорганизмов, содержащих патоген-ассоциированные микробные паттерны (РАМРs), активно изучаются. Было показано, что стрептококки группы А (СГА) серотипа М49 обладают высоким терапевтическим эффектом в отношении перевиваемой опухоли поджелудочной железы у мышей (Maletzki et al., 2008). Предполагается, что основе противоопухолевого эффекта стрептококков лежат иммунологические механизмы. В ходе разработки экспериментальной модели для их изучения нами было исследовано взаимодействие различных штаммов СГА из коллекции Отдела молекулярной микробиологии НИИЭМ СЗО РАМН с клетками сингенной перевиваемой опухоли гепатомы 22а у мышей.

**Целью** данного исследования был поиск наиболее эффективного штамма стрептококков серотипа М49, способного ингибировать рост мышинной гепатомы 22а в культуре ткани *in vitro*, а также развитие данной опухоли у мышей *in vivo*.

СГА культивировались на среде Todd–Hewitt с 0,5% дрожжевым экстрактом при 37 °С в течение суток. Концентрация микроорганизмов определялась спектрофотометрически при длине волны 600 нм и методом счетного высева на плотную среду (Columbia blood agar). Определение генов токсигенности СГА проводилось методом ПЦР с использованием специфических праймеров для генов токсинов (*speA*, *speI*, *speH*). Линия мышинной гепатомы 22а культивировалась в среде DMEM с добавлением 10% FCS. Цитотоксические свойства стрептококков изучали с помощью метода МОИ (multiplicity of infection) (Maletzki et al., 2008). Для этого стрептококки и клетки гепатомы совместно инкубировали в 96-луночных планшетах в течение 4 часов при 37 °С в среде без антибиотиков (200000 кл/мл гепатомы/10<sup>8</sup> КОЕ/мл), после чего количество жизнеспособных клеток гепатомы оценивали спектрофотометрически путем окрашивания метиленовым синим. Для изучения влияния СГА на рост опухоли мышам СЗНА подкожно инокулировали 10<sup>5</sup> клеток гепатомы 22а. Через 14 дней средний размер опухоли достигал 1,5 см<sup>3</sup>. Животным однократно вводили различные штаммы стрептококков внутрь опухоли по 50 мкл в концентрации 10<sup>7</sup> КОЕ/мл и в течение 3 недель проводили измерения размера опухолевых узлов.

Эксперименты *in vitro* показали, что большинство штаммов, обладали цитотоксической активностью по отношению к линии мышинной гепатомы. Из 22 исследованных штаммов 20 обладали различной степенью выраженности цитотоксической активности. Только 2 штамма (№ 1, № 6) не приводили к ингибированию роста опу-

холевых клеток. В дальнейшем исследование были отобраны штаммы (№ 1, 13, 15, 16, 22), которые отличались по данным исследования *in vitro*, а также по спектру генов токсигенности. Эксперимент *in vivo* показал, что эффект внутриопухольевой инъекции СГА М49 серотипа зависел от размеров исходной опухоли у животных и степени токсигенности штамма СГА. Наиболее эффективно замедляли рост опухолей у мышей штаммы СГА № 13 и № 16. У двух животных наблюдалось полное исчезновение опухоли.

В данном исследовании показано, что различные штаммы СГА М49 обладают выраженной способностью ингибировать рост клеток гепатомы 22а в экспериментах *in vitro* и *in vivo*, что указывает на связь данных эффектов со способностью стрептококков экспрессировать гены токсинов *speA*, *speI*, *speH*. В ходе дальнейших исследований будут изучены иммунологические механизмы, опосредующие противоопухолевый эффект стрептококков.

### КЛЮЧЕВЫЕ МУТАЦИИ УСКОЛЬЗАНИЯ ВИРУСА ГЕПАТИТА В: ВСЕ ЕЩЕ МУТАНТ ИЛИ НОВЫЙ ВИРУС?

Сулов А.П., Эльгорт Д.А., Фельдшерова А.А., Баженов А.И., Хац Ю.С., Третьяков О.Ю., Будницкая П.З., Коноплева М.В., Годков М.А., Ольшанский А.Я., Туполева Т.А., Голосова Т.В., Диденко Л.В., Шевлягина Н.В.

ФГБУ «НИИЭМ им. Н.Ф. Гамалеи»

Минздравсоцразвития России, Москва, Россия

**Введение.** Вирус гепатита В (ВГВ) постоянно эволюционирует в течение продолжительного времени, что ведет к его генетическому и серологическому разнообразию. Это разнообразие обусловлено в значительной мере взаимодействием вируса с его единственным хозяином — человеком, а также эволюцией по географическим регионам. Вмешательство человека в эволюционный процесс в виде массовой вакцинации или иммунопрофилактики или противовирусной терапии может ускорить эволюцию вируса, оказав при этом предпочтение его отдельным мутантным формам. Мутант G145R, открытый в 1991 году Carman et al. — это мутантная форма ВГВ, которая характеризуется выраженной серологической модификацией «а» детерминанты малого поверхностного S-белка. Защита против всех генотипов ВГВ определяется антителами, направленными против «а» детерминанты. Эта детерминанта представляет собой совокупность конформационных эпитопов, образованных гидрофильной двухпетельной структурой, образованной и поддерживаемой дисульфидными связями между парами цистеинов, находящимися в 124 и 137, а также в 139 и 147 позициях S-белка. Мутант G145R, затрагивающий позицию 145 во второй петле S-белка, наиболее типичный и стабильный мутант ВГВ диагностического и вакцинального «ускользания». Его обнаруживают при естественной инфекции ВГВ, у вакцинированных лиц с «прорывом» инфекции ВГВ, а также при специфической иммунотерапии. Этот мутант передается как горизонтально, так и вертикально, а инфекция этим мутантным вирусом может приводить к развитию гепатита. Относительно быстрое и широкое распространение мутанта G145R определяется не только его особыми биологическими свойствами, которые в настоящее время остаются мало изученными. Серологические свойства мутанта G145R настолько изменены, что его не распознают значительная часть антител, специфичных к эпитопам дико-

го типа ВГВ. Другая широко распространенная серологически значимая мутация S143L также затрагивает вторую петлю S-белка, но глубина серологических изменений относительно незначительна.

**Цель работы:** оценить взаимосвязь между комплексом серологических, конформационных и морфологических изменений, вызванных ключевыми серологическими мутациями ВГВ, и механизмами эволюции этого вируса.

#### Задачи работы:

- определить глубину серологических изменений HBsAg, вызываемых двумя рядом расположенными в S-гене серологически значимыми мутациями G145R и S143L, в сравнении с диким типом ВГВ, используя модификации ИФА, специально разработанные авторами для характеристики мутантных HBsAg и количественной оценки анти-мутантной активности анти-HBs антител;
- провести электронно-микроскопическое сравнительное исследование морфологии дикого типа ВГВ и его HBsAg-мутантов G145R и S143L;
- охарактеризовать возможную связь серологических различий HBsAg-мутантов с генетической и структурной вариабельностью ВГВ;
- оценить значение глубины структурных, генетических и серологических преобразований HBsAg-мутантов для эволюции ВГВ.

**Материалы и методы.** Сравнительную эпитопную характеристику HBsAg мутантного и дикого типа проводили в твердофазном ИФА с использованием набора из 11 моно- и 1 поликлонального конъюгатов анти-HBs антител по разработанному ранее методу (Баженов и соавт., 2008). Сравнение реактивности против HBsAg мутантного и дикого типа анти-HBs антител, индуцированных при вакцинации против гепатита В, а также от пациентов, переболевших гепатитом В, проводили модифицированным конкурентным методом ИФА с использованием диагностических тест-систем производства «Вектор» Новосибирск (Баженов, 2009). HBsAg-мутанты G145R и S143L были выделены из изолятов, обнаруженных в результате серологического скрининга и генетически охарактеризованных ранее (Баженов и соавт., 2008). Выделение проводили путем ультрацентрифугирования при 70000 g в градиенте сахарозы. Полученные фракции, в которых содержалось минимальное количество общего белка (метод Бредфорд) и максимальное содержание HBsAg (ИФА), использовали для анализа методом негативного контрастирования на трансмиссионном электронном микроскопе JEOL 100B, JEOL Japan Co.). Электронную иммуноцитохимию ВГВ проводили с использованием вторичных антимышиных антител, меченных Au размером 10 нм.

**Основные результаты.** Исследование глубины серологических изменений мутантных вирусов по сравнению с диким типом показало следующие результаты. Модификация S-белка, вызванная мутацией G145R, была кардинальной. Из 11 анти-HBs конъюгатов у 10 активность снижалась на несколько порядков (среднее снижение в 319 раз). У одного моноклонального конъюгата (H2) активность возрастала более, чем на порядок. Серологические изменения, вызванные мутацией S143L, были выражены значительно слабее: резкое (на 3-4 порядка) снижение активности было выявлено для 20% МАТ; активность МАТ H2 также увеличивалась, но всего в 2 раза.

Методом конкурентного ИФА было показано, что среди антител, индуцированных при вакцинации против гепатита В и содержащихся в сыворотке у людей в отно-

сительно высоком титре, практически нет антител против антигенов G145R, тогда как антитела против S143L присутствуют на том же уровне, что и антитела против ВГВ дикого типа. В то же время, у пациентов, переболевших гепатитом В, антитела против G145R имеются, хотя и примерно вдвое меньшем количестве, чем антител против дикого типа.

При исследовании ультраструктуры ВГВ дикого типа были выявлены хорошо описанные ранее частицы ВГВ в основном в виде мелких полиморфных сферических частиц с диаметром 20-30 нм, а также филаментозных форм разной длины, но практически того же диаметра. В изоляте с мутантным вирусом G145R, помимо вышеуказанных частиц, в больших количествах были обнаружены частицы в виде икосаэдра с диаметром более 60 нм, что превышает размер частиц Дейна (42 нм). Методом иммуноцитохимии было показано, что с крупными частицами связываются антитела H2, которые хорошо выявляют мутантный вариант G145R, но не антитела 11F3, связывание которых с мутантом практически отсутствует. Оба типа антител хорошо связывались с ВГВ дикого типа. Таким образом, методом темнопольной электронной микроскопии был обнаружен новый морфологический вариант ВГВ увеличенного размера, который можно ассоциировать с мутантом G145R.

**Заключение.** Полученные нами данные показывают, что глубина серологических изменений поверхностного антигена ВГВ может быть столь значительной, что они могут приводить не только к конформационным изменениям HBsAg, но и к морфологическим изменениям вируса. Выявленные резкие даже по сравнению не только с диким типом, но и с другим широко известным серологически значимым мутантом S143L антигенные, иммуногенные и структурно-морфологические изменения, вызванные мутацией G145R, позволяют предположить, что эта мутация может быть эволюционно ключевой, ведущей к границе образования нового вида.

В пользу данного предположения свидетельствуют данные других авторов, указывающих на особый статус мутации G145R в биологии, серологии и иммунологии ВГВ. Для подтверждения гипотезы необходимы расширенные исследования биологии, морфологии мутанта, особенностей его взаимодействия с иммунной системой, а также механизмов патогенности и распространения мутанта среди разных групп инфицированных ВГВ лиц.

## СВЯЗЫВАНИЕ С-РЕАКТИВНОГО БЕЛКА С ЭНДОТЕЛИАЛЬНЫМИ КЛЕТКАМИ EA.HY 926

Трулев А.С., Назаров П.Г.

НИИ экспериментальной медицины СЗО РАМН, Санкт-Петербург, Россия

Исследования по выявлению маркеров воспаления, которые могли бы быть полезны в качестве прогностических при оценке риска развития сердечно-сосудистых заболеваний, показали, что, среди прочих, пентраксин С-реактивный белок (CRP) — один из наиболее значимых предсказателей возможного инфаркта миокарда или нарушений в работе сосудов. Более того, CRP не только важен в прогностическом отношении, но и сам обладает свойствами, которые могут способствовать или, наоборот, препятствовать развитию атеросклероза. Известно, что основным рецептором для CRP на клетках эндотелия являются Fcγ-рецепторы II класса (CD32). Продемонстрировано сходство в осуществлении функций

CRP и иммуноглобулинов класса IgG, в частности, в таких процессах, как опсонизация бактерий и их структурных компонентов, активация комплемента путем связывания C1q.

Нами было произведено изучение связывания с эндотелиальными клетками человека линии EA.hy 926 очищенного CRP человека, выделенного из асцитной жидкости больных раком (MB Biochemicals, США), который перед использованием диализовали против большого объема забуференного фосфатами физиологического раствора (ЗФР; Биолот, Санкт-Петербург, Россия) в течение 24 часов при 4 °С. Для этого использовали модифицированный клеточный иммуноферментный анализ: за двое суток до эксперимента в лунки 96-луночного планшета вносили клетки линии EA.hy 926 в количестве 15-20 тысяч и инкубировали до образования сплошного монослоя. Затем лунки планшета промывали ЗФР и добавляли 0,05% раствор глутарового альдегида (Reanal, Венгрия) на ЗФР для фиксации клеток. После этого производили блокировку 3% раствором бычьего сырового альбумина. Затем к клеткам добавляли по 50 мкл раствора CRP, меченого биотином, в DPBS с ионами Ca<sup>2+</sup> и Mg<sup>2+</sup> (Биолот) или, если изучали связывание CRP и клеток в условиях без катионов, DPBS без катионов с EDTA. Если в опыте изучали конкуренцию между CRP и человеческим IgG за связывание с клеточными рецепторами, то одновременно с CRP к клеткам добавляли IgG (НИИЭМ им. Пастера, Санкт-Петербург); в контрольных лунках иммуноглобулин отсутствовал. Кроме того, для того, чтобы показать связывание CRP с Fcγ-рецепторами II и III типа на клетках, в лунки одновременно с CRP добавляли антитела против CD16 (Fcγ-рецепторов III типа; МедБиоСпектр, Москва) и CD32 (Fcγ-рецепторов II типа; Catlag Laboratories). В качестве контроля использовали антитела к ICAM-1 (CD54, МедБиоСпектр). По окончании инкубации лунки промывали ЗФР с 0,05% Tween-20, и инкубировали со стрептавидином, конъюгированным с пероксидазой хрена (Calbiochem). После этого лунки опять промывали, добавляли раствор 3,3',5,5'-тетраметилбензидина гидрохлорида (TMB; BD Biosciences, США) и инкубировали в темноте до развития окраски 7 минут, после чего реакцию останавливали добавлением 50 мкл 1 N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Измеряли оптическую плотность продукта реакции при длине волны 450 нм.

Результаты исследования показали, что CRP связывается с клетками независимо от наличия в среде ионов Ca<sup>2+</sup> и Mg<sup>2+</sup>. Причем в отсутствие катионов это связывание происходило даже интенсивнее. Опыты по конкурентному взаимодействию с клетками CRP и IgG, когда к клеткам одновременно добавляли CRP и IgG человека, показали, что при наличии катионов IgG снижает связывание. Тогда как в среде без ионов Ca<sup>2+</sup> и Mg<sup>2+</sup> такого ингибирования не происходило. Кроме того, нам удалось показать, что одновременное добавление к клеткам CRP и антител против Fcγ-рецепторов II и III типа приводит к уменьшению количества связавшегося CRP (на 24% и 35% соответственно, по отношению к связыванию CRP в отсутствие антител) только при наличии в среде катионов Ca<sup>2+</sup> и Mg<sup>2+</sup>. При отсутствии катионов различия с контролем не были достоверны. Таким образом, можно утверждать, что CRP связывается с эндотелиальными клетками не только за счет Fcγ-рецепторов, но и за счет каких-то других кальций-независимых рецепторов. В то же время, ионы кальция способствуют кооперации Fcγ-рецепторов и этих «иных» сайтов связывания CRP на мембране. При агрегации Fcγ-рецепторов

IgG-лигандом в присутствии кальция наблюдается негативная кооперативность и ингибция связывания CRP.

### ИММУНОМОДУЛИРУЮЩЕЕ ДЕЙСТВИЕ КОМПЛЕКСНОГО АДАПТОГЕННОГО РАСТИТЕЛЬНОГО СРЕДСТВА ТИБЕТСКОЙ МЕДИЦИНЫ

Тулесонова А.С.<sup>1</sup>, Хобракова В.Б.<sup>2</sup>, Гатыпова Д.Ю.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Бурятский государственный университет, г. Улан-Удэ, Россия

<sup>2</sup> Институт общей и экспериментальной биологии СО РАН, г. Улан-Удэ, Россия

В настоящее время в связи с усилением эколого-социального прессинга, ростом числа стрессогенных факторов, действующих на человека на современном этапе развития общества, отмечается увеличение числа расстройств, связанных с депрессией адаптационных механизмов организма. Одним из путей поиска и разработки новых лекарственных средств, повышающих неспецифическую сопротивляемость организма, является использование многовекового опыта традиционной тибетской медицины, отличительной особенностью которой является наличие большой группы тонизирующих средств, называемых «жудлэны». Эти средства назначаются для лечения хронических «истощающих» заболеваний, в геронтологической практике, а также для повышения неспецифической сопротивляемости организма. В основополагающих трактатах тибетской медицины (Чжуд-ши, 2001; Кунпан дудзи, 2008), а также в рецептурных справочниках приведено более 60 прописей «жудлэнов», в состав которых входит сырье природного происхождения: 73 вида растительного, 20 видов – животного, 9 – минерального. Нами на основании анализа указанных прописей разработано новое многокомпонентное средство, условно названное «жудлэн № 1», в состав которого входит сырье растительного происхождения: плоды шиповника (*Rosa cinnamomea* L.), боярышника (*Crataegus Sanguinea* Pall.), облепихи (*Hippophae rhamnoides* L.), корни астрагала шерстистоцветкового (*Astragalus dasyanthus* Pall.), левзеи (*Rhaponticum carthamoides* (Willd.) Pjin.) и корневища ревеня (*Rheum palmatum* L.). Данное средство оказывает выраженное адаптогенное действие, повышая неспецифическую резистентность организма к действию стрессорных факторов различной природы. Поскольку известно, что стрессорная реакция, независимо от этиологии повреждающего фактора, сопровождается развитием иммунодефицитных состояний, представляло интерес исследовать влияние указанного средства на состояние иммунной системы организма при экспериментальном иммунодефиците.

**Целью** настоящего исследования явилось определение иммуномодулирующего действия комплексного адаптогенного растительного средства в отношении клеточного и гуморального звеньев иммунного ответа при экспериментальном иммунодефиците.

Эксперименты проведены на мышах-самцах линии СВА массой 18–20 г. Действие исследуемого средства было изучено на животных, находящихся в состоянии иммунодепрессии, вызванной азатиоприном, который вводили контрольной группе животных в дозе 50 мг/кг перорально 1 раз в сутки в течение 5 дней. Водный раствор сухого экстракта в экспериментально-терапевтической дозе 100 мг/кг вводили мышам перорально на фоне азатиоприновой иммуносупрессии в течение 14 дней 1 раз в сутки. Интактная группа животных получала воду очищен-

ную по аналогичной схеме. Состояние гуморального иммунитета оценивали по количеству антителообразующих клеток (АОК), определяемых методом локального гемолиза по А.Д. Cunningham (1965). Состояние клеточного звена иммунного ответа оценивали в реакции гиперчувствительности замедленного типа (ГЗТ) согласно стандартной методике локальной ГЗТ. Полученные результаты обработаны статистическим методом с помощью критерия t-Стьюдента.

В результате проведенных исследований установлено, что введение испытуемого средства на фоне иммуносупрессии приводило к достоверному увеличению количества АОК как в абсолютных значениях, так и при расчете на  $10^6$  спленоцитов в 1,8 и 1,9 раза, соответственно, по сравнению с контролем. При исследовании влияния сухого экстракта на клеточно-опосредованную реакцию ГЗТ установлено, что испытуемое средство существенно увеличивает индекс реакции ГЗТ в условиях азатиоприновой иммуносупрессии в 3,5 раза по сравнению с контролем.

Таким образом, комплексное адаптогенное растительное средство тибетской медицины способно ослаблять супрессивное действие азатиоприна на показатели клеточного и гуморального звеньев иммунного ответа. Эффективность исследуемого средства обусловлена совокупным действием комплекса биологически активных веществ, преимущественно, флавоноидами, фенолкарбонными кислотами, дубильными веществами, полисахаридами, тритерпеновыми сапонинами, витаминами, обладающими выраженными иммуномодулирующими свойствами. Можно полагать, что выявленное иммуномодулирующее действие испытуемого средства является одним из ведущих механизмов реализации его стресспротективной активности.

### ВЛИЯНИЕ СТРЕССА НА ГЕМОПОЭТИЧЕСКУЮ ФУНКЦИЮ МАКРОФАГОВ

Улитко М.В., Быкова М.Ю., Юшков Б.Г.

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

Иммунная система, осуществляя противоинфекционную защиту, поддерживает гомеостаз, участвует в восстановлении нарушенных функций организма, осуществляет контроль роста и регенерации тканей. Особое место в этом процессе отводится макрофагам, стимулирующим регенераторные процессы в кроветворной ткани в физиологических условиях и при действии на организм экстремальных факторов. Располагаясь в центре эритробластического островка, макрофаги костного мозга регулируют пролиферацию и дифференцировку эритроидных клеток. Взаимосвязь макрофагальных механизмов регуляции гемопоэза с другими регуляторными системами организма является актуальной и требует целенаправленных исследований.

**Цель работы:** оценить влияние стрессовых воздействий на гемопоэтическую функцию макрофагов костного мозга. Для этого проанализировали динамику показателей моноцитопоза в костном мозге, активность эритропоэза в эритробластических островках и состоянии периферической крови при кровопотере, гипоксии и иммобилизационном стрессе, а также некоторые механизмы регуляторного влияния надпочечников на эритропоэтическую функцию макрофагов.

Эксперименты выполнены на белых беспородных крысах массой 180-200 г. Активность моноцитопоза определяли путем подсчета общего количества клеток моноцитарного после цитохимической окраски мазков костного мозга по методике G. Gomol. Состояние костномозгового кроветворения определяли на основе количественного и качественного анализа эритробластических островков костного мозга (Ю.М. Захаров, 2001).

**Результаты исследования** приведены в таблице.

При всех указанных стрессовых воздействиях имеет место активация моноцитарного ростка кроветворения. Удаление надпочечников приводит к более значительной пролиферативной активности и миграции моноцитов в кровь, что свидетельствует о наличии дублирующих механизмов регуляции активности системы мононуклеарных фагоцитов.

Все исследованные воздействия активируют гемопоэтическую функцию макрофагов, что проявляется в усилении интенсивности вовлечения КОЕэ в дифференцировку, ускоренном созревании эритроидных клеток в эритробластических островках и повторном вовлечении макрофагов в эритропоз. У адреналэктомированных животных наблюдается ослабление адаптивной реакции эритроидной ткани на стрессовое воздействие, позволяющее предполагать участие гормонов, вырабатываемых надпочечниками в стимуляции эритропоэтической активности макрофагов.

Таким образом, типичной реакцией моноцитарного ростка кроветворения на различные стрессорные воздействия является неспецифическая активация моноцитопоза, сопровождающаяся изменением эритропоэтической функции макрофагов костного мозга и развитием адаптивной реакции в кроветворной ткани.

## СРАВНИТЕЛЬНАЯ ОЦЕНКА ФАРМАКОДИНАМИКИ НОВОГО ОТЕЧЕСТВЕННОГО ПРЕПАРАТА БИОАНАЛОГА РИТУКСИМАБА И ПРЕПАРАТА МАБТЕРА® В ЭКСПЕРИМЕНТАХ *IN VITRO* И *IN VIVO*

Устюгов Я.Ю., Марченко А.В., Вятчанин А.С., Павлова Е.Ю., Кренделева Е.А., Быстров Е.С.

ЗАО «Биокад», Санкт-Петербург, Россия

Ритуксимаб – химерные моноклональные антитела (человек/мышь) к трансмембранному антигену В-лимфоцитов человека CD 20, используемые для лечения В-клеточных неходжкинских лимфом, а также ряда аутоиммунных заболеваний. Клиническая практика применения ритуксимаба и его аналогов показала высокую эффективность, сочетающуюся с низкой токсичностью и минимальной иммуногенностью (Hauptrock B., Hess G., 2008; Roche Investigator's Brochure, 2006). Недостатком терапевтических схем, включающих ритуксимаб, является высокая стоимость импортных препаратов моноклональных антител. В настоящее время российские фармацевтические компании не производят препараты данного класса, что обуславливает актуальность разработки и внедрения в клиническую практику отечественного препарата биоаналога ритуксимаба.

**Целью** данного исследования являлось проведение сравнительной оценки фармакодинамики (*in vitro*, *in vivo*) нового отечественного препарата биоаналога ритуксимаба (ЗАО «Биокад») и препарата сравнения Мабтера® (Hoffmann-La Roche).

Для определения специфической активности *in vitro* использовали комплемент зависимый цитотоксический тест. Оценку проводили по подавлению пролиферации экспрессирующих антиген CD20-клеток линии WIL2-S (В-лимфоциты человека, ATCC кат. номер CRL-8885).

ТАБЛИЦА (К ТЕЗИСАМ УЛИТКО М.В. И ДР.)

Время после воздействия	Количество моноцитов костного мозга на 100 г массы тела, млн.	Количество моноцитов периферической крови, Г/л	Показатель интенсивности вовлечения КОЕэ в дифференцировку, $\times 10^3$ /бедро	Показатель созревания эритробластического островка, отн. ед.	Показатель повторного вовлечения макрофагов в эритропоз, отн. ед.
Интактные	1,34±0,04	0,28±0,03	31,8±4,6	1,65±0,08	0,43±0,01
Кровопотеря					
6 ч	2,29±0,12*	0,37±0,07	40,0±5,2	0,48±0,03*	1,66±0,18*
1 сут	2,37±0,16*	0,59±0,05*	51,5±3,8*	1,02±0,06*	0,92±0,07*
3 сут	1,83±0,15*	0,34±0,01	82,3±9,2*	1,09±0,04*	0,93±0,08*
Гипоксия					
4 сеанса	1,82 ± 0,26*	0,24±0,02	36,26±2,01	0,26±0,06*	1,54±0,17*
7 сеансов	2,26 ± 0,28*	0,28±0,04	107,99±6,49*	0,33±0,04*	0,62±0,05
Имобилизационный стресс					
6 часов	2,99±0,46*	0,21±0,02	27,03±5,06	0,54±0,025*	1,48±0,09*
2-е сутки	2,59±1,1*	0,57±0,06*	109,90±7,49*	0,41±0,09*	1,30±0,25*
Имобилизационный стресс на фоне адреналэктомии					
6 часов	4,58±0,65* **	0,67±0,06* **	21,98±2,03	0,66±0,07*	0,68±0,04**
2-е сутки	3,06±0,57*	0,62±0,09**	64,36±5,06* **	0,31±0,02*	1,16±0,05*

**Примечание.** \* – достоверные различия от интактных животных; \*\* – достоверные отличия адреналэктомированных животных от группы без адреналэктомии.

Результат выражали, как процент от значения, полученного для коммерческого препарата Мабтера®. Исследования *in vivo* были выполнены на яванских макаках. Каждая группа включала 4 животных, которым однократно вводили препараты в дозе 100 мг/кг, животные контрольной группы получали изотонический раствор хлорида натрия. Уровень В-лимфоцитов определяли методом проточной цитометрии с использованием моноклональных антител (BD).

Полученные результаты сравнительного исследования нового отечественного препарата биоаналога ритуксимаба и препарата Мабтера® в системе *in vitro* показали сходную по своему значению специфическую активность (табл.).

После однократного внутривенного введения сравниваемых препаратов у обезьян опытных групп популяция CD20-позитивных В-клеток в периферической крови не обнаруживалась уже через час после инъекции. Отсутствие в периферическом кровотоке В-лимфоцитов наблюдалось в течение 10 недель, после чего значение фонового уровня В-клеток восстанавливалось к 15 неделе. Согласно данным, представленным в таблице, видно, что динамика восстановления числа CD20-позитивных клеток является сходной для сравниваемых групп.

В ходе исследования на яванских макаках установлено, что исследуемый препарат биоаналог ритуксимаба и препарат Мабтера® оказывают аналогичный по выраженности и продолжительности действия эффект в отношении В-лимфоцитов периферической крови приматов.

Полученные сравнительные экспериментальные данные по фармакодинамике нового отечественного препарата биоаналога ритуксимаба (ЗАО «Биокад») и коммерческого препарата Мабтера® (Hoffmann-La Roche), в исследованиях *in vitro* и *in vivo* свидетельствуют об их аналогичной специфической активности.

### ВЛИЯНИЕ КОМПЛЕКСНОГО РАСТИТЕЛЬНОГО СРЕДСТВА «ИММУНОПОЛИФИТ» НА СОСТОЯНИЕ ИММУННОЙ СИСТЕМЫ ОРГАНИЗМА

**Хобракова В.Б.**

*Институт общей и экспериментальной биологии  
СО РАН, г. Улан-Удэ, Россия*

Несмотря на успехи современной медицины, лечение заболеваний, в патогенез которых вовлекается иммунная система, остается сложной задачей. Применяемые методы терапии либо недостаточно эффективны, либо сопровождаются развитием побочных реакций. В последние годы значительно возрос интерес к препаратам растительного происхождения, для большинства которых характерно мягкое иммуномодулирующее действие, низ-

кая токсичность и отсутствие выраженных побочных эффектов благодаря наличию комплекса биологически активных веществ, оказывающих воздействие на организм в целом. Объектом настоящего исследования явилось комплексное растительное средство – сухой экстракт «Иммунополифит», в состав которого входят корни солодки голой и вздутоплодника сибирского, семена льна обыкновенного, плоды лимонника китайского и шиповника иглистого, трава горца птичьего и пустырника сердечного, соцветия ноготков лекарственных.

**Целью** настоящего исследования явилось определение иммуномодулирующих свойств растительного средства – сухого экстракта «Иммунополифит».

Эксперименты проведены на мышах-самцах линий СВА и F<sub>1</sub> (СВАхС57В1/6) массой 18-20 г. Действие исследуемого экстракта было изучено на интактных животных, а также животных, находящихся в состоянии иммунодепрессии, вызванной цитостатиком азатиоприном, который вводили контрольной группе животных в дозе 50 мг/кг перорально 1 раз в сутки в течение 5 дней. Исследуемое средство вводили 1-ой опытной группе на фоне азатиоприна и 2-ой опытной группе интактных мышей в виде водного раствора в экспериментально-терапевтической дозе 40 мг/кг перорально ежедневно в течение 14 дней. Интактная группа животных получала воду очищенную по аналогичной схеме. Действие испытуемого средства на состояние клеточного звена иммунного ответа оценивали в реакции гиперчувствительности замедленного типа (ГЗТ) согласно стандартной методике локальной ГЗТ, гуморального звена – по количеству антителообразующих клеток, определяемых методом локального гемолиза по А.Д. Cunningham (1965), макрофагального звена – в реакции фагоцитоза перитонеальных макрофагов в отношении *Staphylococcus aureus in vitro* по методике И.С. Фрейдлин (1976). Влияние экстракта в концентрациях 0,4; 4 и 40 мкг/мл на пролиферативную активность Т- и В-лимфоцитов селезенки мышей изучали *in vitro* в реакции бластной трансформации в присутствии митогенов: конканавалина А и липополисахарида по включению 3Н-тимидина с использованием сцинтилляционного счетчика.

На основании проведенных исследований установлено, что введение исследуемого экстракта на фоне иммуносупрессии приводило к достоверному увеличению количества АОК как в абсолютных значениях, так и при расчете на 10<sup>6</sup> спленоцитов в 1,9 и 1,5 раза, соответственно, по сравнению с контролем. При исследовании влияния экстракта на клеточно-опосредованную реакцию ГЗТ установлено, что испытуемое средство увеличивает индекс реакции ГЗТ в 1,3 раза по сравнению с контролем. При оценке влияния экстракта на фагоцитоз перитонеальных макрофагов установлено, что испытуе-

**ТАБЛИЦА. ФАРМАКОДИНАМИЧЕСКИЕ ПОКАЗАТЕЛИ ПРЕПАРАТОВ МОНОКЛОНАЛЬНЫХ АНТИТЕЛ ПРОТИВ ТРАНСМЕМБРАННОГО АНТИГЕНА ЛИМФОЦИТОВ ЧЕЛОВЕКА CD20 (К ТЕЗИСАМ УСТЮГОВА Я.Ю. И ДР.)**

Препарат	Фармакодинамические показатели							
	<i>in vitro</i> , %	<i>in vivo</i> , количество В-клеток *10 <sup>9</sup> /л						
		фон	1-10 нед	11 нед	12 нед	13 нед	14 нед	15 нед
Биоаналог ритуксимаба	94,1	0,41±0,09	0,00	0,004±0,00	0,05±0,00	0,10±0,01	0,22±0,03	0,43±0,10
Мабтера®	-	0,60±0,09	0,00	0,002±0,00	0,04±0,00	0,09±0,01	0,36±0,05	0,64±0,13

мое средство приводит к увеличению активности и интенсивности фагоцитоза в 1,4 и 1,3 раза, соответственно, по отношению к контролю. При оценке влияния экстракта на пролиферацию Т- и В-лимфоцитов селезенки мышей *in vitro* установлено, что «Иммунополифит» в концентрации 0,4 мкг/мл стимулирует пролиферацию В-лимфоцитов в 1,3 раза и значимо не изменяет пролиферацию Т-лимфоцитов по сравнению с контролем. Исследуемый экстракт не изменяет показатели иммунитета у интактных мышей. Это свойство изучаемого экстракта очень важно, поскольку оно присуще лишь истинным иммуномодуляторам, обладающим активностью только в условиях повреждения иммунитета.

Таким образом, сухой экстракт «Иммунополифит» обладает выраженными иммуномодулирующими свойствами при азатиоприновой иммунодепрессии, что выражается в повышении показателей клеточного, гуморального и макрофагального звеньев иммунного ответа. За эффект 8-компонентного сухого экстракта ответственны флавоноиды, содержащиеся в траве горца и пустырника, соцветиях календулы, корнях солодки; полисахариды, содержащиеся в плодах лимонника; тритерпеновые сапонины, содержащиеся в корнях солодки и траве пустырника; эфирные масла, содержащиеся в корнях вздутоплодника; каротиноиды, содержащиеся в соцветиях календулы, семенах льна обыкновенного; витамины, содержащиеся в плодах шиповника. Полученные данные позволяют заключить, что «Иммунополифит» является эффективным иммуномодулирующим средством, что аргументирует целесообразность его дальнейшего изучения с целью создания новых эффективных иммуномодуляторов.

#### **ЗАВИСИМОСТЬ ТЕЧЕНИЯ РЕПАРАТИВНЫХ ПРОЦЕССОВ В ЩИТОВИДНОЙ ЖЕЛЕЗЕ ОТ СОСТОЯНИЯ ИММУННОЙ СИСТЕМЫ**

Храмцова Ю.С., Тюменцева Н.В., Янович С.В.

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

Щитовидная железа относится к числу «забарьерных» органов, иммунологическая регуляция регенерации которых отличается от таковой для других тканей организма и, соответственно, требуют своей расшифровки механизмы этого процесса. Цель исследования: изучение процессов репаративной регенерации щитовидной железы при стимуляции различных звеньев иммунной системы.

Исследование выполнено на белых крысах самцах, которым проводили субтотальную резекцию обеих долей щитовидной железы на фоне введения иммунокорректоров, действующих на разные звенья: 1. тактивина (2 мкг/кг курсом 5 инъекций), миелопида (0,1 мг/кг курсом 5 инъекций) или галавита (2 мг/кг курсом 5 инъекций). Состояние железы оценивали через 7 суток после операции по гистологическому алгоритму с использованием морфометрического анализа структурных элементов железы с помощью программы SIAMS. В качестве контроля служили животные без введения препаратов. При статистической обработке данных использовали критерии Стьюдента и Манна–Уитни.

У контрольных животных в паренхиме железы наблюдалась картина полиморфизма фолликулов. Достоверно увеличивались высота тиреоидного эпителия и диаметр ядер тироцитов. Коллоид тесно прилегал к стенкам фолликулов. Между фолликулами отмечалось увеличение ко-

личества интерфолликулярных островков. Все признаки свидетельствовали о повышении функциональной активности железы.

При активации различных звеньев иммунной системы иммунокорректорами морфологическая картина щитовидной железы после резекции отличалась от контроля. Так, при стимуляции макрофагов размер фолликулов уменьшался. Между ними отмечалась пролиферация интерфолликулярного эпителия. В целом регенерация железы протекала без признаков нарушения стромально-клеточного соотношения, а увеличение количества интерфолликулярных островков, по сравнению с контролем, указывало на ускорение восстановительных процессов в щитовидной железе. При активации В-звена в щитовидной железе после резекции развивались изменения характерные для тиреоидной дисфункции со снижением количества и активности функционирующей паренхимы. При активации Т-лимфоцитов в железе происходили изменения, свидетельствующие о ее повышенной функциональной активности и активации репаративных процессов. Так, средний диаметр фолликулов был меньше по сравнению с контролем. Объем коллоида в фолликулах уменьшался. Количество интерфолликулярных островков было достоверно больше по сравнению с контрольными животными. Таким образом, активация отдельных звеньев иммунной системы при частичной резекции щитовидной железы приводит к различному течению репаративных процессов в ней. При этом ускорению репаративных процессов в щитовидной железе способствует стимуляция макрофагов.

Работа проведена в рамках реализации ФЦП «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» на 2009-2013 годы.

#### **ИММУНОМОРФОЛОГИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ ХРОНИЧЕСКОГО ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО АУТОИММУННОГО ПРОСТАТИТА ПРИ ГИПЕРАНДРОГЕНЕМИИ**

Цветков И.С., Макарова О.В., Мхитаров В.А.

*УРАМН НИИ морфологии человека РАМН, Москва, Россия*

Патогенетические механизмы хронического простатита и синдрома хронической тазовой боли связывают с развитием аутоиммунных реакций против простатических антигенов, таких как простатоспецифический антиген, простатическая кислая фосфатаза, сперминсвязывающий белок, секретоглобин (Ponnai S. et al., 2000). У 36-56% мужчин с синдромом хронической тазовой боли выявляются клеточные и гуморальные антитела к простатическим антигенам. В последние годы при лечении андрогенной недостаточности, метаболического синдрома, а также в спортивной медицине стали широко использоваться половые стероиды (Верткин А.Л., Пушкарь Д.Ю., 2009; Blouin K., et al., 2005). Влияние гиперандрогенемии на течение хронического аутоиммунного воспаления в предстательной железе не изучено.

**Целью работы** была оценка структурно-функциональных изменений предстательной железы, уровня половых гормонов и цитокинового профиля при экспериментальном хроническом аутоиммунном простатите, протекающем на фоне гиперандрогенемии.

**Материалы и методы.** Проводили исследование на 4 группах крыс самцов Вистар массой тела 240-280 г: кон-

трольной, с хроническим аутоиммунным простатитом (ХАП), с повышенным уровнем андрогенов в сыворотке крови, ХАП на фоне гиперандрогенемии. Модель ХАП воспроизводили по М. Depiante-DePaoli (1984). Гиперандрогенемии моделировали путем введения фармакологического препарата омнадрена в дозе 165 мг/кг. В культуральной жидкости спленоцитов методом ИФА определяли концентрацию IL-2, IL-4, IL-6, IL-12, IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$ , TGF- $\beta$  («Bender Medsystems», Австрия). В сыворотке крови методом ИФА определяли уровень общего и свободного тестостерона («Adaltis», Италия). Использовали гистологические методы с окраской препаратов предстательной железы гематоксилином и эозином, толуидиновым синим с целью выявления тучных клеток. Индекс дегрануляции тучных клеток оценивали по методу Д.П. Линдер (1980). Статистическую обработку полученных данных проводили в программах Statistica 7.0, Microsoft Excel с использованием параметрических и непараметрических методов. Статистически значимыми различия считали при  $p \leq 0,05$ .

**Результаты исследования и их обсуждение.** При морфологическом исследовании предстательной железы крыс, которым вводили гомонат добавочных желез с адьювантом Фрейнда, выявлялась картина ХАП, характеризующаяся сочетанием дистрофических, десквамативных и пролиферативных изменений эпителия ацинусов, расширением их просвета, диффузно-очаговой инфильтрацией из лимфоцитов, гистиоцитов, тучных клеток, очаговым фиброзом внутридольковой стромы.

По данным морфометрического исследования, при ХАП по сравнению с контрольной группой объемная доля ацинусов достоверно увеличивалась, а эпителия — снижалась, и повышался относительный показатель десквамированных эпителиальных клеток. Соответственно объемная доля стромы снижалась, а клеточного инфильтрата увеличивалась.

У крыс с гиперандрогенемией по сравнению с контрольной группой возрастал показатель объемной доли ацинусов, десквамированного эпителия и клеточного инфильтрата, достоверно снижалась объемная доля стромы, ацинарного эпителия. Среди клеток инфильтрата достоверно снижалось относительное число нейтрофилов и увеличивалось число тучных клеток. Индекс дегрануляции тучных клеток возрастал. Показатели уровня всех исследованных цитокинов при гиперандрогенемии по сравнению с контролем достоверно снизились, за исключением IL-6, уровень которого достоверно не изменился. В предстательной железе крыс с ХАП на фоне гиперандрогенемии, по сравнению с ХАП на фоне физиологического уровня андрогенов, отмечалась более выраженная диффузная воспалительная инфильтрация за счет увеличения числа тучных клеток, а процентное содержание лимфоцитов было более низким.

**Выводы.** По данным морфологического и морфометрического исследования, при хроническом аутоиммунном простатите, в отличие от контрольной группы в центральной доле предстательной железы достоверно увеличивается объемная доля воспалительного инфильтрата, процентное содержание лимфоцитов и тучных клеток, достоверно возрастает объемная доля ацинусов, показатель числа десквамированного эпителия, уровень продукции спленоцитами провоспалительных цитокинов (TNF $\alpha$ ), Th1-цитокинов (IL-2, IFN $\gamma$ ) и Th2-цитокина (IL-4) снижается.

При гиперандрогенемии, вызванной введением омнадрена, повышается уровень общего и свободного тестостерона в сыворотке крови, возрастает объемная доля

клеточного инфильтрата за счет увеличения числа тучных клеток. По сравнению с контрольной группой при гиперандрогенемии достоверно увеличивается объемная доля ацинусов, резко возрастает показатель числа десквамированного эпителия, уровень цитокинов достоверно снижается.

При ХАП на фоне гиперандрогенемии, в отличие от ХАП при неизменном уровне тестостерона показатель объемной доли ацинусов, числа десквамированных эпителиальных клеток, клеточного инфильтрата был достоверно более высоким, а процентное содержание лимфоцитов в нем более низким.

### **ГЛЮКОКОРТИКОИД-ЗАВИСИМЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ СОДЕРЖАНИЯ КАРИОЦИТОВ И УРОВНЯ СВОБОДНО-РАДИКАЛЬНОГО ОКИСЛЕНИЯ ПРИ ГИПОКИНЕТИЧЕСКОМ СТРЕССЕ**

**Цейликман В.Э., Филимонова Т.А., Стрельникова Л.А., Стрельников И.В., Осиков М.В., Цейликман О.Б.**

*Челябинская государственная медицинская академия, г. Челябинск, Россия*

Различные стрессорные факторы оказывают модифицирующее влияние на характер иммунного ответа. Ранее нами было показано, что 1 суточная (ГК1) и 3 суточная гипокинезия (ГК3) характеризуются сниженным уровнем клеточного и гуморального иммунитета. Механизм, обуславливающий развитие этого феномена может иметь глюкокортикоид-зависимый характер.

Поэтому **целью** данного исследования являлось сопоставление иммуотропного эффекта ГК-1 и ГК-3 с чувствительностью иммунных органов к пролонгированному глюкокортикоидному препарату триамцинолона ацетониду (ТА). Установлено, что в после завершения однодневного и трехдневного гипокинетического воздействия наблюдалось угнетение иммунного ответа. При ГК1 выраженность реакции гиперчувствительности замедленного типа (ГЗТ), характеризующей Th1-зависимый иммунный ответ снижалось на 38% при ГК1 ( $P = 0,046U$ ) и на 42% ( $P = 0,037U$ ) при ГК3. При этом уровень Th2-зависимого иммунного ответа не претерпел статистически значимых изменений. Выполненные исследования показали, что иммуносупрессивное действие гипокинетического стресса развивалась на фоне повышенной чувствительности вилочковой железы и костного мозга к гипоплазирующему действию глюкокортикоидного препарата триамцинолон ацетонида (ТА). Так, через 96 часов после инъекции ТА нестрессированным животным наблюдалась инволюция тимуса, что проявлялась в снижении на 40% количества ядродержащих клеток (ЯСК) в органе. В данном случае введение глюкокортикоидного препарата повлекло за собой снижение интенсивности свободно-радикального окисления в органе. Это проявлялось в снижении на 70% количества нейтральных карбонилированных белков ( $P = 0,019U$ ). Кроме того, на 30% снизилось содержание изо-пропанол растворимых кетодиенов и сопряженных триенов ( $P = 0,006U$ ). Гипоплазирующее действие глюкокортикоидного препарата в той же мере распространялась на костный мозг. Причем снижение содержания миелонуклеаров в группе «стресс + ТА» ассоциируется с угнетением эритропоэза. Вероятно, это связано с глюкокортикоид-зависимой миграцией лимфоцитов в костный мозг. Развитие ТА-зависимой гипоплазии костного мозга сопряжено со снижением содержания окислительно-модифицированных белков. Это проявля-

лось в уменьшении на 38% количества нейтральных карбонилированных белков ( $P = 0,028U$ ) при одновременном уменьшении на 23% количества основных карбонилированных белков ( $P = 0,044U$ ). Гипоплазирующее действие глюкокортикоидного препарата на селезенку прежде всего выразилось в снижении содержания лимфоцитов. При этом в органе на 50% повышено содержание нейтрофилов ( $P = 0,039U$ ). Введение глюкокортикоидного препарата нестрессированному животному привело к угнетению процесса свободно-радикального окисления в органе. Это проявлялось в снижении на 65% количества нейтральных карбонилированных белков ( $P = 0,009U$ ), в двукратном снижении уровня основных карбонилированных белков ( $P = 0,009U$ ), а также в снижении содержания гептан-растворимых диеновых конъюгатов ( $P = 0,009U$ ). В тоже время в органе отмечено увеличение содержания изо-пропанол-растворимых кетодиенов и сопряженных триенов ( $P = 0,009U$ ). Для животных группы «ГК1 + ТА» по сравнению с группой «ТА» характерен более низкий уровень тимоцитов. Дальнейшие исследования показали, что механизм ГК1-зависимой сенсилизации тимуса к действию триамцинолона ацетонида связан с усугублением глюкокортикоид-зависимого угнетения пролиферации тимоцитов. Так, введение триамцинолона ацетонида нестрессированному животному привело к снижению количества пролиферирующих тимоцитов (пик М3) при одновременном увеличении количества апоптотических клеток. Введение глюкокортикоидного препарата после завершения ГК1 привело к дальнейшему угнетению ПОЛ. Это проявлялось в снижении на 18% содержания изо-пропанол-растворимых диеновых конъюгатов ( $P = 0,028U$ ) и на 37% содержания изо-пропанол-растворимых кетодиенов и сопряженных триенов ( $P = 0,014U$ ). Таким образом, непродолжительный гипокинетический стресс сопровождался развитием иммуносупрессии, ассоциированной с гипоплазией иммунных органов, и с усилением в них процесса липопероксидации.

### ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ ПОДХОДЫ К МОДИФИКАЦИИ МАТРИЦЫ ИММУНОСТИМУЛИРУЮЩИХ КОМПЛЕКСОВ (ИСКОМ)

Цыбульский А.В.<sup>1</sup>, Попов А.М.<sup>2</sup>, Портнягина О.Ю.<sup>2</sup>, Костецкий Э.Я.<sup>1</sup>, Санина Н.М.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Дальневосточный федеральный университет, г. Владивосток, Россия

<sup>2</sup> Тихоокеанский институт биоорганической химии ДВО РАН, г. Владивосток, Россия

**Введение.** При получении вакцинных препаратов на основе субъединичных антигенов (АГ) исследователи сталкиваются с проблемой их низкой иммуногенности. В связи с этим применяются различные иммуноадьюванты, в смеси с которыми АГ инъецируется в организм. Одним из наиболее перспективных адьювантов считаются ИСКОМы – гексагональные наноразмерные структуры, состоящие из фосфолипидов, холестерина и сапонины QuilA. Однако применению вакцин на основе ИСКОМ мешает характерная для них токсичность, связанная с гемолитической активностью QuilA.

**Цель и задачи.** Цель работы – модификация структуры ИСКОМ для снижения их токсичности. Поставлены задачи изучить возможность замены фосфатидилхолина (ФХ) и QuilA на молекулы моногалактозилдиацилглице-

рола (МГДГ) и тритерпенового гликозида кукумаризида А<sub>2</sub>-2 (КД).

**Материалы и методы.** В работе использовали беспородных белых мышей и мышей линии СВА.

МГДГ получали из различных морских макрофитов, КД – из голотурии *Cucumaria japonica*.

Липид-сапониновые комплексы (ЛСК) получали по разработанной нами технологии и оценивали электронно-микроскопически при увеличении  $\times 50000$ . Выделяли тубулярно-ИСКОМные (ТИ) комплексы, тубулярно-липосомальные (ТЛ) комплексы, классические ИСКОМы и ИСКОМы, модифицированные заменой ФХ на МГДГ (ИСКОМ-МГДГ).

В качестве АГ использовали гидрофобную, мономерную форму порина – белка наружной мембраны *Yersinia pseudotuberculosis* с М.М. 36 кД. ЛСК с порином получали путем самосборки. Иммунизацию мышей порином самостоятельно и в составе ЛСК производили двукратно с интервалом в 14 суток внутрибрюшинно. Для сравнительной оценки адьювантных свойств носителей использовали полный адьювант Фрейнда (ПАФ). Содержание антипориновых антител определяли в сыворотке крови мышей через 28 суток методом иммуноферментного анализа.

Для дополнительной модификации ЛСК использовали тималин (Т) (ООО «Самсон-Мед», Россия). Добавление Т к ЛСК производили одновременно с порином из расчета дозы Т в 100 мкг/мышь.

Статистическую обработку результатов проводили методом параметрического анализа с использованием *t*-критерия Стьюдента. Достоверность различий оценивали при  $p < 0,05$ .

**Основные результаты.** При оценке адьювантных свойств ИСКОМ, модифицированных МГДГ, выявлено усиление их адьювантной активности в сравнении с классическими ИСКОМ. Однако, это не решало задачи по оптимизации баланса токсичности ИСКОМ и их адьювантной активности, т.к. основной вклад в токсичность ИСКОМ обеспечивают сапонины QuilA. Замена QuilA на гликозид КД привела к формированию различного рода наноструктур. Наибольший интерес вызвали структуры, полученные при одновременной замене ФХ на МГДГ из морской водоросли *Ulva fenestrata*, и QuilA – на КД. Наряду с классическими ИСКОМ образуются тубулярные структуры диаметром около 40 нм и длиной 150-400 нм. Для образования таких ТИ-комплексов требовалось присутствие МГДГ и КД. Замена только ФХ на гликолипид сохраняла классическую для ИСКОМ гексагональную структуру, тогда как замена только QuilA на КД приводила к образованию сети тубул и липосомоподобных везикул – ТЛ-комплексов. ИСКОМ в этом случае не обнаруживалось. Установлено, что матрица ТИ-комплексов проявляет меньшую токсичность в сравнении с ИСКОМ. Встраивание АГ в матрицу не приводит к изменению морфологической структуры и токсических свойств ТИ-комплекса. Таким образом, в результате проведенных работ получен нановакцинный препарат против возбудителя псевдотуберкулеза, в котором субъединичный антиген инкорпорирован в структуру матрицы ЛСК. Установлены различия ( $p < 0,05$ ) в содержании специфических антипориновых антител в сыворотке крови мышей, иммунизированных АГ самостоятельно и в составе ЛСК. Иммунизация животных порином в составе ЛСК позволяет усилить иммунный ответ. ТИ-комплексы проявляют более выраженную адьювантную активность,

чем классические и модифицированные ИСКОМ, ТЛ-комплексы и ПАФ.

Для усиления адьювантных свойств ЛСК мы добавили в их матрицу препарат Т. Встраивание Т в состав ЛСК приводит к росту их адьювантной активности. Включение Т в ТИ- комплекс оказывается наиболее эффективно и приводит к возрастанию содержания специфических антипориновых антител до максимальных значений по сравнению со всеми другими изученными вариантами ЛСК.

**Заключение.** Получен новый тип адьюванта и носителя для субъединичного белкового антигена, имеющий меньшую токсичность в сравнении с ИСКОМ, – ТИ-комплексы. Доказана возможность усиления иммуоадьювантных свойств ТИ-комплексов путем дополнительного встраивания в их матрицу иммуоактивных пептидов тимуса.

Работа поддержана грантом Правительства РФ (ГК № 11.G34.31.001) и грантом аналитической ведомственной целевой программы «Развитие научного потенциала высшей школы» (2009-2010 гг.) по проекту № 2.2.2/603.

### ВЛИЯНИЕ ИНТРАНАЗАЛЬНОГО МЕТОДА ВВЕДЕНИЯ АНТИГЕНОВ УСЛОВНО ПАТОГЕННЫХ БАКТЕРИЙ НА ИММУНОФЕНОТИП И ФУНКЦИОНАЛЬНУЮ АКТИВНОСТЬ КЛЕТОК ЛИМФОИДНЫХ ОРГАНОВ

Чертов И.В., Сорокина Е.В., Хоменков В.Г., Ахматов Э.А., Мурадян А.Г., Переверзев А.Д.

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

Первой линией защиты от патогенов, для которых слизистые оболочки являются входными воротами инфекции, служит врожденная мукозальная иммунная система, обладающая для выполнения этой функции многофакторными эффекторными механизмами, позволяющими в нормальных условиях поддерживать гомеостаз между организмом и окружающей средой.

**Цель:** исследовать особенности активации иммунокомпетентных клеток кишечника, регионарных лимфатических узлов и системного иммунитета (по показателям динамики экспрессии иммунокомпетентных молекул, Toll-подобных рецепторов), цитотоксичности и локализации различных популяций лимфоцитов в лимфоидных органах при иммунизации поликомпонентной вакциной Иммуовак<sup>®</sup>, состоящей из антигенов условно патогенных микроорганизмов, вводимой интраназальным методом. Оценку субпопуляционной структуры лимфоцитов осуществляли методом проточной цитометрии с применением моноклональных антител (МКА) (Caltag Laboratories, США) против клеточных антигенов. Цитотоксическую активность МЛ селезенок против опухолевой линии клеток К-562 определяли в тесте восстановления 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолия бромида (МТТ-тест).

При интраназальном методе введения Иммуовак<sup>®</sup> происходила активация ключевых эффекторов мукозального иммунитета – Т $\gamma\delta$  и В1-лимфоцитов, а также популяций CD3, CD4, CD8, экспрессия МНС1 и МНСII не только в регионарном лимфоидном аппарате, но и в селезенке. Пероральный метод характеризовался значительным повышением натуральных киллеров, что совпало с наибольшей цитотоксичностью мононуклеаров, выделенных из слизистой тонкого кишечника. Исследования показали, что при мукозальной иммунизации проис-

ходит активация не только местного, но и системного иммунитета, что подтверждается нарастанием титров специфических антител и защитой мышей при заражении вирулентными штаммами *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus vulgaris* и *Streptococcus pneumoniae*.

Полученные результаты оценивали по кратности повышения относительного числа клеток-эффекторов, экспрессирующих дифференцировочные, активационные маркеры, маркеры антигенного представления и TLRs в лимфоидных органах мышей в NALT/BALT и GALT при интраназальном методе введения Иммуовак-ВП-4. Отмечено значительное повышение на клетках-эффекторах лимфатических узлов NALT/BALT и селезенки исследованных показателей. В лимфатических узлах NALT/BALT относительное содержание Т $\gamma\delta$  увеличивалось в 32 раза (с 0,05 до 1,6)%, В1 (CD5) в 8,1 раза (с 0,21 до 1,7)% CD3 и CD4 в 6 и 4 раза соответственно. В селезенке уровень Т $\gamma\delta$  возрос в 16 раз (с 0,17 до 2,8)%, В1 в 10,9 раза (с 0,08 до 0,87)%. В селезенке в большей степени, чем в лимфатических узлах NALT/BALT, увеличивался уровень CD4 (в 28,4). По экспрессии молекул антигенного представления при интраназальном методе введения отличие состояло в том, что в лимфатических узлах NALT/BALT в большей степени повышалось содержание молекул МНСII (в 45 раз), тогда как в селезенке МНСI (в 34 раза). Интересно, что в слизистой оболочке кишечника все исследованные показатели изменялись в меньшей степени по сравнению с селезенкой и лимфатическими узлами NALT/BALT.

Иммуовак-ВП-4 содержит патоген-ассоциированные структуры 4-х видов условно патогенных микроорганизмов (*S.aureus*, *K. pneumoniae*, *P. vulgaris*, *E. coli*) в виде ЛПС, пептидогликана, белков, липоидных кислот и т.д., что предопределяет действие этого препарата на экспрессию на клетках широкого набора TLRs. При интраназальном введении наиболее значительное увеличение было в лимфатических узлах (TLR4 и TLR9), несколько меньшее в селезенке, но в ней увеличивалось в 5-10 раз экспрессия всех 3-х исследованных рецепторов. В слизистой оболочке кишечника сдвигов не было.

Важно отметить, что некоторые клоны клеток пролиферировали очень активно, и их содержание в исследуемых органах увеличивалось в десятки раз. Этот процесс в значительной степени определяется особенностями активации врожденного иммунитета, присущими мукозальным методам введения вакцинных препаратов.

### ВЛИЯНИЕ РЕКОМБИНАНТНЫХ ЦИТОКИНОВ (TGF- $\beta$ 1 И IL-2) НА CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> КЛЕТКИ ПРИ КУЛЬТИВИРОВАНИИ ЛИМФОЦИТОВ КРОВИ

Чуров А.В., Олейник Е.К., Олейник В.М., Жулай Г.А., Кравченко П.Н.

Учреждение РАН Институт биологии КарНЦ РАН, г. Петрозаводск, Россия

Исследования последних лет выявили важную роль трансформирующего фактора роста- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) в регуляции иммунных реакций организма. Известно, что TGF- $\beta$  контролирует функции различных видов иммунных клеток (Т-хелперов, ЦТЛ, В-клеток, дендритных клеток, натуральных киллеров), оказывая преимущественно иммуносупрессорное действие на клетки.

Показано, что TGF- $\beta$  в большом количестве секретируется регуляторными Т-лимфоцитами. Одним из важнейших механизмов функционирования TGF- $\beta$  счита-

ется способность этого цитокина усиливать дифференцировку регуляторных CD4<sup>+</sup> клеток, экспрессирующих мембранный активационный маркер CD25 ( $\alpha$ -цепь рецептора к IL-2). Поэтому представляет большой интерес изучение роли этого цитокина в контроле различных состояний иммунной системы: аутоиммунитета, реакции трансплантат против хозяина, противоинфекционной и противоопухолевой защиты организма.

**Целью** настоящего исследования было изучение влияния рекомбинантного человеческого TGF- $\beta$ 1 на CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> клетки при культивировании лимфоцитов периферической крови в зависимости от его концентрации (0, 1, 2, 5, 10, 20 нг/мл), а также в присутствии экзогенного IL-2 (10 нг/мл). Для культивирования лимфоциты периферической крови человека выделяли на градиенте фикола плотностью 1,077 г/см<sup>3</sup>. Лимфоциты стимулировали с использованием анти-CD3-антител (2 мкг/мл). Культивирование проводили в 96-луночных планшетах, с применением питательной среды RPMI-1640 (25 mM HEPES, 2 mM/мл L-глутамин, 100 мкг/мл гентамицина) в CO<sub>2</sub>-инкубаторе при температуре 37 °C, 5% содержании CO<sub>2</sub> в течение 24 часов. После инкубации клетки отмывали и проводили анализ на проточном цитометре FC500 (Beckman Coulter, США).

Оказалось, что с увеличением концентрации рекомбинантный TGF- $\beta$ 1 оказывает ингибирующее действие на CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> клетки при культивировании, что выражается в уменьшении относительного содержания CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> лимфоцитов, а также снижении интенсивности флуоресценции по CD25. При концентрации TGF- $\beta$ 1, равной 1 нг/мл, количество CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> клеток существенно не отличалось от исходного уровня (0 нг/мл), тогда как наиболее сильный ингибирующий эффект был отмечен при максимальной концентрации цитокина – 20 нг/мл.

Характер воздействия TGF- $\beta$ 1 на клетки изменялся при добавлении в культуру экзогенного IL-2. При этом исходный уровень содержания CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> лимфоцитов, соответствующий концентрации TGF- $\beta$ 1 равной 0 нг/мл, был несколько выше, чем в тех образцах, где присутствовал только TGF- $\beta$ 1. С увеличением концентрации TGF- $\beta$ 1 от 0 нг/мл до 2 нг/мл при культивировании лимфоцитов в присутствии равных доз IL-2, относительное количество CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> клеток возрастало, что, по-видимому, могло быть обусловлено кооперативным действием цитокинов на экспрессию молекул CD25. Наиболее высокое содержание CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> лимфоцитов, как в опытных образцах, так и в контроле достигалось при концентрации TGF- $\beta$ 1 равной 2 нг/мл. В дальнейшем, с увеличением концентрации TGF- $\beta$ 1 до 5 нг/мл, наблюдалось незначительное снижение количества лимфоцитов, несущих маркер CD25. Однако численность CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> клеток при этом оставалась на высоком уровне. Начиная с концентрации 10 нг/мл, отмечалось ингибирующее действие TGF- $\beta$ 1 на клетки, а воздействие цитокина в концентрации 20 нг/мл почти полностью нивелировало эффект от присутствия IL-2.

Таким образом, исходя из результатов эксперимента, можно заключить, что TGF- $\beta$ 1 оказывает ингибирующее действие на лимфоциты при их культивировании, в результате чего с ростом концентрации супрессорного цитокина происходит снижение экспрессии молекул CD25. Наличие в культуре лимфоцитов дополнительно экзогенного IL-2 оказывает положительный кооперативный эффект на CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> лимфоциты, что выражается в возрастании их количества при относительно низких

концентрациях TGF- $\beta$ 1 (1-5 нг/мл). Важно отметить, что увеличение численности CD25<sup>+</sup> клеток, может быть связано как с изменениями фенотипа клеток при их активации, так и с возрастанием числа регуляторных лимфоцитов в процессе культивирования. По некоторым данным, IL-2 и TGF- $\beta$  при совместном воздействии могут способствовать индукции фенотипа Treg-клеток, усилить экспрессию FoxP3, а также мембранного маркера CD25 (Davidson et al., 2007; Zheng et al., 2007).

Работа выполнена в рамках Программы Президиума РАН «Фундаментальные науки – медицине» и при финансовой поддержке РФФИ (проект № 08-04-98838).

## ИЗУЧЕНИЕ РЕПЕРТУАРА ЕСТЕСТВЕННЫХ АУТОАНТИТЕЛ ПРОТИВ ТИРЕОГЛОБУЛИНА

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

*ФГУ Российский научный центр радиологии и хирургических технологий МЗСР РФ, Санкт-Петербург, Россия*

Аутоантитела, выявляемые у людей и животных при очевидном отсутствии антигенных стимулов, называют естественными (ЕАА). Продукция их начинается в организме в период эмбрионального развития и сохраняется в течение всей жизни. Характерными признаками ЕАА являются их принадлежность к изотипу IgM, низкий аффинитет и полиреактивность, то есть способность взаимодействовать с широким кругом эволюционно консервативных антигенов, к числу которых относятся тиреоглобулины (Tg) позвоночных животных. На молекулах Tg обнаруживают до 40 антигенных детерминант. Многие из них представлены на Tg животных различных видов. Детерминанты Tg, распознаваемые ЕАА, до настоящего времени изучены недостаточно.

**Цель работы** заключалась в изучении репертуара ЕАА против Tg у мышей двух инбредных линий, одна из которых (BALB/c) резистентна, а другая (SJL/j) восприимчива к индукции аутоиммунного тиреоидита.

Среди полученных в лаборатории мышинных моноклональных антител (МКАТ) было отобрано 19 реагентов, взаимодействующих с Tg мыши. Для изучения свойств МКАТ использовали методы иммуногистохимического анализа; прямого, непрямого и ингибиторного иммуноферментного анализа (ИФА). Аффинитет МКАТ определяли по методике Фрике. Каждое МКАТ распознает на мышинном Tg отдельный эпитоп. Большинство реагентов взаимодействует с эволюционно консервативными эпитопами Tg млекопитающих и/или птиц и обладает низким аффинитетом ( $< 10^{-7} \text{ M}^{-1}$ ). Около 30% реагентов относятся к IgM и связываются с ацетилхолинэстеразой, тиреоидной пероксидазой, кардиомиозином и инсулином. Таким образом, отобранные МКАТ можно рассматривать в качестве моноклональных вариантов ЕАА.

Для изучения репертуара ЕАА против Tg получены глобулиновые фракции индивидуальных сывороток интактных мышей SJL/j (n = 6) и BALB/c (n = 6). Методом непрямого ИФА установлено, что во всех образцах содержатся ЕАА против Tg. Специфичность этих ЕАА в отношении эпитопов Tg мыши, выявляемых использованными в работе МКАТ, изучали с помощью метода ингибиторного ИФА. Для этого образцы сывороток инкубировали в лунках планшетов с иммобилизованным Tg и затем определяли связывание с ним каждого из 19 МКАТ. Все сывороточные образцы ингибировали взаимодействие с Tg мыши большинства МКАТ. Связыванию 30% реа-

гентов с антигеном препятствовали сыворотки 2-5 мышей каждой линии. Таким образом, все эпитопы, к которым направлены МКАТ, распознаются ЕАА. Сопоставление свойств изучаемых ЕАА и МКАТ позволяет предположить, что ЕАА мышей распознают эволюционно консервативные эпитопы Тg и, по-видимому, способны перекрестно связывать инсулин, кардиомиозин, тиреоидную пероксидазу и ацетилхолинэстеразу. Показано, что как минимум половина эпитопов Тg распознается ЕАА мышей. При этом репертуар мышинных ЕАА, взаимодействующих с Тg, варьирует индивидуально и не коррелирует с генетически обусловленной восприимчивостью к развитию аутоиммунного тиреоидита.

### ИММУНОМОРФОЛОГИЧЕСКИЕ ПОДХОДЫ К ИЗУЧЕНИЮ ГЕРПЕС-ВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИИ В ЭКСПЕРИМЕНТЕ

Шевлягина Н.В., Боровая Т.Г., Диденко Л.В., Иванова А.М., Измествева А.В., Санин А.В., Пронин А.В., Наровлянский А.Н.

ФГБУ «НИИЭМ им. Н.Ф. Гамалеи»

Минздрава России, Москва, Россия

Герпес-вирусная инфекция (в том числе генитальная, вызванная вирусом простого герпеса 2-го типа [ВПГ-2]) широко распространена в популяции взрослого населения и является одной из причин бесплодия, невынашивания беременности, развития внутриутробных пороков и онкологических заболеваний. Для изучения и оценки эффективности препаратов для лечения и профилактики герпес-вирусной инфекции необходимо проводить исследования органов и тканей — мишеней для данного вида инфекции. Морфофункциональные изменения органов женской репродуктивной системы, особенно яичников, в условиях генитальной герпес-вирусной инфекции не изучены.

**Цель исследования:** установить является ли яичник органом-мишенью для герпес-вирусной инфекции; определить структурные компоненты яичника уязвимые для атаки вируса простого герпеса 2 типа; оценить эффективность действия полипренилфосфатов (как иммуномодулирующих препаратов с противовирусной эффективностью) на яичники при генитальном герпесе.

Для достижения поставленной цели перспективными являются микроскопический (включая световую и электронную микроскопию), иммуноцитохимический и иммунофлуоресцентный методы.

Объекты исследования — яичники морских свинок в условиях экспериментальной острой и хронической генитальной герпес-вирусной инфекции до и после лечения полипренилфосфатами, а также яичники неинфицированных морских свинок (контроль).

Показано, что в условиях действия ВПГ-2 в яичниках происходит: резкое снижение объема популяции овариальных фолликулов за счет активации процесса атрезии; преимущественное поражение полостных фолликулов (гонадотропин-зависимых) стадий; массовая лейкоцитарная инфильтрация фолликулярного эпителия вторичных фолликулов; вакуолизация цитоплазмы и пикноз ядер овоцитов; отек мозгового вещества с признаками лейкопедеза, гипертрофия волокнистого компонента межклеточного матрикса стромы, активация кистообразования; расширение сосудов.

Имуноцитохимическим и иммунофлуоресцентным методами было обнаружено, что иммунная метка на ВПГ-2 локализовалась в ядрах, околядерном про-

странстве и митохондриях эпителиоцитов кист сети яичников, клеток фолликулярного эпителия и текацитов.

После проведения лечения инфицированных морских свинок препаратом полипренилфосфатом натрия в яичниках морских свинок выявлено наличие здоровых фолликулов всех стадий развития; отсутствие лейкоцитарной инфильтрации фолликулярного эпителия вторичных атретических фолликулов; отсутствие отека мозгового вещества яичников и признаков лейкопедеза; формирование только единичных кист.

Таким образом, установлено, что яичник поражается при герпес-вирусной инфекции. Наиболее уязвимыми при генитальной герпес-вирусной инфекции являются полостные фолликулы, по сравнению с примордиальными. Показано, что препарат группы полипренилфосфатов оказывает протективное действие на яичники при острой и хронической генитальной герпес-вирусной инфекции.

### ВЛИЯНИЕ ТИРОКСИНА И АГОНИСТА БЕТА-АДРЕНорецепторов ГЕКСОПРЕНАЛИНА СУЛЬФАТА НА ПРОЛИФЕРАТИВНЫЙ ОТВЕТ ЛИМФОЦИТОВ И ПРОДУКЦИЮ ИММУНОГЛОБУЛИНОВ *IN VITRO*

Шилов Ю.И.<sup>1,2</sup>, Годовалов А.П.<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН, г. Пермь, Россия

<sup>2</sup> ГОУ ВПО «Пермская государственная медицинская академия им. акад. Е.А. Вагнера Росздрава», г. Пермь, Россия

Адренергические соединения и тиреоидные гормоны играют важную роль в нейроэндокринной регуляции функций иммунной системы в норме и патологии. Известно, что тиреоидные гормоны повышают экспрессию бета-адренорецепторов и/или внутриклеточную трансдукцию с них сигнала в клетках-мишенях различных органов. Функциональные последствия реализации такого взаимодействия на уровне иммунной системы изучены недостаточно.

**Цель работы:** исследование влияния агониста бета-адренорецепторов гексопреналина сульфата на пролиферативный ответ лимфоцитов и продукцию иммуноглобулинов в присутствии тироксина в системе *in vitro*.

**Материалы и методы.** Мононуклеарные клетки периферической крови, полученной от 17 практически здоровых мужчин-добровольцев (средний возраст — 24 года), выделяли в градиенте плотности фиколл-верографина. Использовали агонист бета-адренорецепторов гексопреналина сульфат (Nuscamed, Австрия), действующий более избирательно на бета<sub>2</sub>-адренорецепторы, в концентрации 10<sup>-6</sup> М, а также растворимую форму L-тироксина — пентагидрат натриевой соли L-тироксина (Sigma, США) в концентрациях 10<sup>-8</sup>, 10<sup>-9</sup> и 10<sup>-10</sup> М. Все соединения вносили в культуры одновременно с митогеном. Поликлональный тимусзависимый пролиферативный ответ В-лимфоцитов оценивали в культурах с митогеном лаконоса (PWM, Sigma, США) в оптимальной концентрации 2,5 мкг/мл или без него (2 × 10<sup>5</sup> клеток/лунку в среде 199 с добавлением 10 мМ HEPES, 2 мМ L-глутамин, 100 мкг/мл гентамицина сульфата, 10% аутоплазмы). Через 72 или 120 ч культивирования оценивали пролиферативный ответ лимфоцитов по включению метил-<sup>3</sup>H-тимидина. При оценке продукции иммуноглобулинов культивирование клеток с PWM осуществляли в аналогичных условиях в течение 288 ч, но в культуральную среду вместо аутоплазмы вносили 10% сыворотки крови плодов коровы

(SUS-BIOL, Биолот, Россия). Определение концентрации иммуноглобулинов в супернатантах культур проводили с использованием коммерческих тест-систем согласно инструкции производителя («IgM общий–ИФА–БЕСТ», «IgG общий–ИФА–БЕСТ», Вектор-Бест, Новосибирск). Состояние всех культур дополнительно контролировали морфологически. Статистический анализ результатов проводили с учетом log-нормального распределения показателей пролиферации лимфоцитов и концентрации иммуноглобулинов в культурах. Для оценки статистической значимости различий связанных попарно данных использовали непараметрический ранговый критерий Вилкоксона и *t*-критерий Стьюдента для парных данных. Различия считались статистически значимыми при  $p < 0,05$ .

**Основные результаты.** При совместном воздействии тироксина в концентрации  $10^{-10}$  М с гексопреналином сульфатом выявляется статистически значимое в сравнении с контролем снижение пролиферации лимфоцитов в 120-часовых культурах с PWM. В культурах с одновременным внесением бета-адренергического агониста и тироксина в концентрации  $10^{-9}$  М уровень пролиферации в 72-часовых культурах с PWM снижается в сравнении с культурами с добавлением только тироксина или гексопреналина сульфата, а в 120-часовых – по отношению к культурам только с бета-адреномиметиком. При концентрации тироксина  $10^{-8}$  М изменения отсутствуют. При внесении в культуры тироксина без агониста бета-адренорецепторов отмечается только снижение спонтанной пролиферации лимфоцитов в 120-часовых культурах без митогена при концентрации гормона  $10^{-9}$  М, а одного бета-адренергического агониста – отсутствие изменений. Тироксин в концентрациях  $10^{-8}$  и  $10^{-9}$  М повышает в сравнении с контролем продукцию IgG в 288-часовых культурах мононуклеарных клеток с PWM, не влияя на уровень IgM. Внесение совместно с тироксином агониста бета-адренорецепторов отменяет этот эффект, концентрация IgG в этих культурах не отличается от контроля.

**Заключение.** Выявлены угнетение пролиферативного ответа лимфоцитов и отмена стимулирующего действия тироксина на продукцию IgG в культурах мононуклеарных клеток периферической крови практически здоровых людей с митогеном лаконоса при совместном воздействии гексопреналина сульфата и тироксина.

Работа поддержана грантами РФФИ 10-04-96092p\_урал\_a и 11-04-96047p\_урал\_a, Программы Президиума РАН «Молекулярная и клеточная биология».

## ЭКСПРЕССИЯ ГИПЕРИММУНОГЕННОГО АНТИГЕНА *M. TUBERCULOSIS* AG85B В РЕКОМБИНАНТНОМ АДЕНОВИРУСНОМ ВЕКТОРЕ

Щербинин Д. Н.<sup>1</sup>, Тутыхина И.Л.<sup>1</sup>, Логунов Д.Ю.<sup>1</sup>, Шмаров М.М.<sup>1</sup>, Апт А.С.<sup>2</sup>, Кондратьева Т.К.<sup>2</sup>, Народицкий Б.С.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> ФГБУ «НИИЭМ им. Н.Ф. Гамалеи»

Минздравсоцразвития России, Москва, Россия

<sup>2</sup> Центральный Институт Туберкулеза РАМН, Москва, Россия

Белки-химеры, в состав которых входят антигены возбудителя инфекции в сочетании с иммунологически активными доменами, также как и «синтетические гены», кодирующие такие белки, привлекают интерес как потенциальные компоненты вакцин. В последнее время появляется все больше данных об успешной иммунизации антигенами, химически связанными с адьювантами. В представляемой работе мы сконструировали ген, кодирующий трехкомпонентный белок, состоящий из антигена Ag85B *M. tuberculosis*, лиганда для TLR5-флагеллина *S. enterica*, и Fc-фрагмента антител IgG2a мыши. В этой конструкции лиганд для TLR5 представляет собой адьювант, который активирует реакции врожденного иммунитета, а за счет Fc-фрагмента антитела происходит проникновение антигена в клетку, где происходит его процессинг и последующая презентация в контексте молекул главного комплекса тканевой совместимости. Кроме того, за счет Fc-фрагмента происходит димеризация молекул, что, по-видимому, способствует образованию кластеров рецепторов и увеличивает количество поглощаемого антигена.

**Цель** нашего исследования заключалась в проверке защитных свойств трехкомпонентной конструкции, экспрессируемой в аденовирусном векторе, в модели туберкулезной инфекции у мышей.

Нами были созданы следующие рекомбинантные аденовирусы: 1) Ad-Ag85B – аденовирус, кодирующий только антиген Ag85B; 2) Ad-Ag85B-Flagelline – аденовирус, кодирующий антиген Ag85B и флагеллин; 3) Ad-Ag85B-Flagelline-Fc – аденовирус, кодирующий тройной белок-химеру, антиген Ag85B + флагеллин (лиганд TLR5) + Fc-фрагмент антител IgG2a. Экспрессию Ag85B и Fc-фрагмента определяли методом Western blot. Способность данного белка активировать TLR5 тестировали в искусственной эукариотической тест-системе на основе клеточной линии HEK293.

Полученные результаты свидетельствуют о том, что иммунизация двумя первыми вариантами рекомбинантных аденовирусов не защищает мышей от туберкулеза. Добавление в кодирующую последовательность «флагеллин + Fc-фрагмент» последовательности, кодирующей антиген микобактерий, привело к специфической протекции. Таким образом, увеличение иммуногенности антигенов микобактерий, экспрессируемых в составе рекомбинантных аденовирусных векторов, может рассматриваться как перспективный подход при конструировании противотуберкулезных вакцин.