

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

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ЦИТОКИНОВ ДЛЯ СТИМУЛЯЦИИ СПЕЦИФИЧЕСКОГО ИММУННОГО ОТВЕТА

Алпатова Н.А., Авдеева Ж.И., Акользина С.Е.,
Медуницын Н.В.

*Федеральное государственное бюджетное учреждение
«Научный центр экспертизы средств медицинского
применения» (ФГБУ «НЦЭСМП») Минздрава РФ,
Москва, Россия*

Особенности развития иммунного ответа при вакцинации зависят, прежде всего, от свойств самой вакцины (вида возбудителя, технологии производства), пути и схемы введения вакцины, а также функционального состояния и генетических особенностей организма. Для оптимизации вакцинального процесса в настоящее время используются различные адъюванты, которые отличаются друг от друга по своему происхождению и механизму действия. Адъюванты подразделяют на два основных типа, одни известны как система доставки вакцины, обеспечивающая оптимальные условия поступления АГ к компонентам иммунной системы. Вторые - иммуностимуляторы, которые усиливают иммунный ответ на АГ вакцины путём активации системы врождённого иммунитета, увеличения поглощения АГ антигенпредставляющими клетками, повышения выработки стимулирующих молекул и эндогенных медиаторов, включая провоспалительные цитокины. Целесообразность использования адъювантов заключается в повышении иммуногенности АГ, изменении характера иммунного ответа, снижении количества АГ, необходимого для успешной иммунизации, уменьшении кратности введения вакцины и повышении интенсивности иммунного ответа у лиц со сниженной иммунологической активностью, в том числе при патологии и у лиц пожилого возраста.

Задачей данной работы являлась оценка на экспериментальных моделях адъювантных свойств цитокинов, их влияния на протективную активность вакцин против клещевого энцефалита, бешенства, гепатита А и гепатита В, а также изучение зависимости эффекта исследуемых препаратов цитокинов от величины использованной дозы АГ и схемы иммунизации животных.

Введение одновременно с вакциной против гепатита А цитокинов рчФНО α , рчИЛ-1 β , рчИЛ-2, рчИФ γ способствовало формированию более высоких титров специфических АГ (в 2,5-13,5 раза) и обеспечивало 100 % сероконверсию животных после окончания введения препаратов. Уровень сероконверсии в группе животных, иммунизированных одной вакциной, составлял 72-89 %.

Цитокины повышают протективный эффект антирабической вакцины КОКАВ, оцениваемый по уровню резистентности беспородных белых мышей к заражению

фиксированным вирусом бешенства. Наиболее выраженная защита отмечена при применении вместе с вакциной комплекса рекомбинантных цитокинов (ФНО α +ИЛ-1 β +ИЛ-2), который увеличивал показатель выживаемости животных в 7,3 раза по сравнению с животными, иммунизированными без цитокинов. При этом развитие иммунного ответа сопровождалось формированием более высокого уровня вируснейтрализующих АТ, превышающих в 3,3-6,0 раз уровень титров АТ у контрольных животных.

Установлено стимулирующее действие ряда цитокинов на иммуногенную активность вакцины против клещевого энцефалита (ВКЭ). Исследуемые препараты цитокинов повышали протективный эффект вакцины ВКЭ, оцениваемый по уровню резистентности мышей линии Balb/c к заражению вирулентным штаммом «Абсеттаров» вируса клещевого энцефалита. Наиболее выраженное действие оказывали рчФНО α , рчИЛ-1 β , имунофан или гибридный белок «неотим», используемые в виде монопрепаратов, которые усиливали иммуногенность вакцины в 1,3-1,5 раза.

Введение вместе с вакциной против гепатита В цитокинов рчИЛ-1 β , рчИЛ-2 в виде монопрепаратов или комплекса приводит к увеличению числа серопозитивных животных по сравнению с контрольной группой интактных животных. Меньшая доза АГ в сочетании с цитокинами вызывала иммунный ответ, сопоставимый с ответом на большую дозу АГ, вводимого без цитокинов. Иммуноадъювантное действие цитокинов на интенсивность иммунного ответа при использовании малых доз АГ наиболее демонстративно проявляется при иммунизации животных с иммуносупрессией, индуцированной циклофосфаном.

Таким образом, результаты проведенных экспериментов показали, что использование цитокинов в качестве адъювантов способствует созданию более эффективной и надежной защиты при иммунизации животных исследуемыми вакцинами.

ВЛИЯНИЕ МНОГОКРАТНОЙ ТРАНСПЛАНТАЦИИ ИММУНОКОМПЕТЕНТНЫХ КЛЕТОК НА ПАРАМЕТРЫ ПОВЕДЕНИЯ И ФУНКЦИОНАЛЬНУЮ АКТИВНОСТЬ ИММУННОЙ СИСТЕМЫ У МЫШЕЙ (СВАХС57BL/6)F1

Аникеева О.С.

*ФГБНУ «НИИ фундаментальной и клинической
иммунологии», Новосибирск, Россия*

Необходимость изучения взаимодействий нейроэндокринной и иммунной систем в онтогенезе продиктовано их важнейшей ролью в поддержании гомеостаза

и правильного развития организма. При этом процесс их развития не является строго детерминированным генетически: на него могут влиять и различные эпигенетические факторы. Известно, что животные с активным и пассивным типами ориентировочно-исследовательского поведения (ОИП) различаются по функциональной активности иммунной системы; показана также возможность модуляции поведенческой активности мышей трансплантацией иммунокомпетентных клеток с определенными функциональными характеристиками. В связи с вышеизложенным, целью настоящего исследования было изучение влияния многократной трансплантации клеток иммунной системы на параметры поведения и интенсивность развития иммунных реакций у реципиентов на ранних этапах онтогенеза.

Материалы и методы исследования: Исследование выполнено на 286 мышках-самцах (СВАхС57BL/6)F1 различного возраста (178 мышей 4-5-недельного возраста и 108 особей 12-недельного возраста). Содержание экспериментальных животных соответствовало правилам, принятым Европейской конвенцией по защите животных, используемых для экспериментальных целей (Страсбург, 1986). Для определения параметров ОИП применялся тест «открытое поле». В исследовании, в качестве доноров клеток для трансплантации использовались животные с активным и пассивным типами поведения. Спленоциты от животных с оппозитными типами поведения вводили внутривенно сингенным реципиентам (трехкратно в дозе 5×10^6 в 0.4 мл в среде RPMI-1640, начиная с 4-5 недельного возраста). Контрольную группу составили интактные мыши соответствующего животным опытных групп возраста, выросшие в аналогичных условиях, но без специального воздействия. Высоту реакции гиперчувствительности замедленного типа (ГЗТ) оценивали по методу Y. Yoshikai (1979). Для математической обработки полученных данных использовалась статистическая компьютерная программа STATISTICA 10.0 for Windows (Stat Soft, USA) с применением парного критерия Манна-Уитни. Результаты представлены в виде $M \pm s$. Различия считались достоверными при $p < 0,05$.

Результаты. Ранее нами было установлено, что иммунокомпетентные клетки (ИКК) животных с оппозитными типами поведения различаются по функциональной активности. Так, показано, что спленоциты животных с активным типом поведения по сравнению со спленоцитами животных с пассивным типом поведения обладают более высоким уровнем спонтанной и митоген-индуцированной пролиферативной активности, различным уровнем продукции основных регуляторных цитокинов и экспрессии их генов в головном мозге и в селезенке. В настоящем исследовании нами установлено, что 3-х кратная трансплантация спленоцитов, выделенных от доноров с оппозитными типами поведения, реализуется в направленном изменении параметров поведения у реципиентов в половозрелом возрасте.

При анализе поведенческой активности реципиентов было выявлено, что после трансплантации клеток от доноров с активным типом поведения в популяции половозрелых реципиентов регистрировалось 2,5 – кратное увеличение процентного содержания особей с активным типом поведения по сравнению с контрольной группой интактных животных аналогичного возраста (29,2% и 11,9%, соответственно). При этом регистрировалось снижение процентного содержания особей с пассивным

типом поведения примерно в 5 раз по сравнению с таковым у мышей контрольной группы (4,2 %, и 19,1%, соответственно); что свидетельствует о повышении уровня ОИП у преобладающей части животных в выросшей популяции. В то же время, после трансплантации спленоцитов от доноров с пассивным типом поведения в популяции половозрелых реципиентов процентное содержание особей с пассивным типом поведения 2-кратно увеличивалось по сравнению с таковым в контрольной группе интактных животных аналогичного возраста (42,5% и 19,1%, соответственно); при одновременном снижении процентного содержания особей с активным типом поведения в 4.8 раза по сравнению с контрольной группой животных (2,5% и 11,9%, соответственно). Полученные данные свидетельствуют о понижении уровня ОИП у подавляющей части животных в исследуемой популяции. Следовательно, представленные результаты демонстрируют возможность формирования определенного стереотипа поведения у экспериментальных животных в онтогенезе путем многократной трансплантации клеток иммунной системы с определенными функциональными характеристиками.

При исследовании параметров функциональной активности иммунной системы было установлено, что высота реакции ГЗТ у реципиентов после трансплантации ИКК от доноров с активным типом поведения имела более высокие значения, а от доноров с пассивным типом поведения имела более низкие значения по сравнению с таковой в контрольной группе мышей (38,2 (30÷47,4); 15,85 (13,6÷20) и 23,8 (12,25÷30,8), соответственно).

Заключение: таким образом, представленные результаты характеризуют особенности влияния многократной трансплантации клеток иммунной системы на параметры поведения и интенсивность развития иммунных реакций у реципиентов на ранних этапах онтогенеза и демонстрируют возможность формирования определенного стереотипа поведения у реципиентов в половозрелом возрасте.

ПРОТИВОВОСПАЛИТЕЛЬНАЯ АКТИВНОСТЬ БЕЛКОВ γ-ГЛОБУЛИНОВОЙ ФРАКЦИИ: ИНГИБИРОВАНИЕ ВЫРАБОТКИ КЛЕТКАМИ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА ФАКТОРОВ РОСТА

Апресова М.А., Мездрохина А.С., Чекнёв С.Б.

*ФГБУ «Федеральный научно-исследовательский центр
эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф. Гамалеи»
Минздрава России, Москва, Россия*

В условиях, приближенных к физиологическим, белки γ-глобулиновой фракции хелатируют из периглобулярного пространства катионы металлов, претерпевают вследствие этого конформационные преобразования в области их Fc региона и обретают новые эффекторные свойства, реализующиеся посредством активации Fc рецепторов клеток и отличающие их от белков в нативной конформации Fc региона. Комплекс γ-глобулина с цинком снижает выработку IFN-γ и раннего IL-2, а комплекс γ-глобулина с медью ингибирует продукцию раннего IL-1β и IL-6, индуцированную контрольными белками и изолированно катионами металлов. Одновременно, белковые комплексы с цинком и медью индуцируют выработку IL-10, усиливая развитие Th2 ответа и проявляя противовоспалительные свойства.

Целью работы явилась оценка выработки клетками периферической крови (КПК) человека факторов роста GM-CSF, G-CSF и VEGF, индуцированных металлокомплексами γ -глобулина, образованными с катионами меди и цинка.

Материалы и методы. Индукцию GM-CSF, G-CSF и VEGF в суспензиях КПК человека (10^6 клеток в 1 мл) проводили в полной питательной среде, в культуральных условиях, в течение 24, 48 и 72 час. Образцы модифицированного катионами меди или цинка человеческого сывороточного γ -глобулина (ICN) и контрольных белков применяли в конечной концентрации 0.5 мкг/мл. Концентрация металлов в катионных контролях составляла: цинка – 1.5 и 2.5 нг/мл, меди – 1.0 нг/мл и соответствовала количеству катионов, связавшихся с белком на препаративном этапе исследования. Контрольными индукторами выработки служили фитогемагглютинин Р (ФГА, Difco, 1.0 мкг/мл) и вирус болезни Ньюкасла (10 ЦПД на клетку). Содержание GM-CSF, G-CSF и VEGF в супернатантах индуцированных КПК определяли методом ИФА с использованием ELISA Processor II (Behring) и наборов для ИФА ЗАО «Вектор-Бест». Полученные супернатанты тестировали в исходном состоянии и в разведении исходного образца питательной средой 1/10. Достоверность различия средних величин устанавливали с помощью *t*-критерия Стьюдента.

Результаты. Белки γ -глобулиновой фракции, а также катионы меди и цинка, примененные изолированно, на сроке 48 час наблюдения индуцируют выработку КПК человека до 12.5 пг/мл GM-CSF, до 15.3 пг/мл G-CSF и до 440 пг/мл VEGF, что в 1.2-4.9 раза ($p < 0.001$) превышает уровень спонтанной продукции. Образование металлокомплексов γ -глобулина снижает индуцирующий потенциал формирующих комплекс белков и катионов металлов. Комплекс с цинком индуцирует в 1.3-5.0 раза ($p < 0.001$) меньше GM-CSF, G-CSF и VEGF, чем его белковый и катионный контроль. Комплекс с медью реализует в 1.3-13.1 раза ($p < 0.001$) меньшую по сравнению с контролями индуцирующую активность.

Заключение. Трансформированные связыванием катионов меди и цинка γ -глобулины реализуют противовоспалительную активность. Она проявляется не только на уровне выработки цитокинов Th1 и Th2 ответа, но и ингибированием продукции КПК человека комплекса ростовых факторов GM-CSF, G-CSF и VEGF, обладающих выраженными провоспалительными свойствами.

ГЕМОЛИТИЧЕСКАЯ И ЦИТОТОКСИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ ПЕПТИДОВ – СИНТЕТИЧЕСКИХ АНАЛОГОВ ПЕПТИДА СЕМЕЙСТВА КАТЕЛИЦИДИНОВ

Артамонов А.Ю.¹, Орлов Д.С.^{1,2}, Шамова О.В.^{1,2}, Колодкин Н.И.³, Смирнова М.П.³

¹ Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Институт экспериментальной медицины», Санкт-Петербург, Россия

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

³ Федеральное государственное унитарное предприятие «Государственный научно-исследовательский институт особо чистых биопрепаратов» Федерального медико-биологического агентства России, Санкт-Петербург, Россия

Важнейшими защитными соединениями системы врожденного иммунитета являются катионные антимикробные

пептиды (АМП) нейтрофильных гранулоцитов, оказывающие прямое антибактериальное и фунгицидное действие, обладающие иммуномодулирующей активностью и, таким образом, являющиеся перспективными корректорами защитных функций, нарушенных при различных дестабилизирующих воздействиях. Практическое применение АМП как потенциальных лекарственных средств ограничено их токсическим действием на клетки человека. Поэтому актуальна оценка гемолитических и цитотоксических эффектов синтетических модификаций природных пептидов, с высокой антибактериальной активностью для отбора наименее токсичных для клеток человека АМП.

Целью работы было изучение гемолитической и цитотоксической активности синтетических аналогов природного пептида индолицидина лейкоцитов коровы, относящегося к семейству кателицидинов. Остаток пролина (P) этих структурных вариантов индолицидина (Ind, ILPWKWPWPWRR-NH₂) заменен на остатки различных аминокислот, не встречающихся в АМП позвоночных: бета-аланина (β A), аминобутировой кислоты (Abu), аминокислоты пентановой кислоты (Acp), аминокислоты валина (Ava). Изучены следующие пептиды: Ind23 (IL- β A-WKW- β A-WW- β A-WRR-NH₂), Ind34 (IL-Abu-WKW-Abu-WW-Abu-WRR-NH₂), Ind35 (IL-Acp-WKW-Acp-WW-Acp-WRR-NH₂) и Ind36 (IL-Ava-WKW-Ava-WW-Ava-WRR-NH₂).

При исследовании эффектов синтетических пептидов Ind23, Ind34, Ind35 и Ind36 на эритроциты человека с использованием фотометрического метода показано, что все изученные пептиды обладают слабо выраженной гемолитической активностью. При действии этих пептидов в концентрации 100 мкМ лизису подвергалось 13; 15; 13 и 11% клеток, соответственно, в то время, как для природного Ind гемолиз эритроцитов достигал 30%.

С помощью МТТ теста проведена оценка цитотоксичности пептидов Ind23, Ind34, Ind35, Ind36 и Ind, в отношении клеток эритромиелоидного лейкоза человека К-562. Пептиды инкубировали с клетками К-562 в течение 24 ч, после чего определяли значения ИК₅₀ (50% ингибирующая концентрация) пептидов. Величины ИК₅₀ для перечисленных выше пептидов составили 3,7; 2,6; 5,6 и 5,8 мкМ, соответственно, по сравнению с ИК₅₀ = 3,1 мкМ для индолицидина.

Встраивание рассматриваемых в работе остатков аминокислот в молекулу природного пептида индолицидина выявило один из эффективных способов снижения гемолитической активности этого пептида. Синтетический пептид Ind36, у которого остаток пролина заменен на остаток аминокислоты валина проявил наименьшую гемолитическую и цитотоксическую активность в отношении исследуемых клеток. Работа поддержана грантом РФФИ № 13-04-02102а и Программой «Протеом человека».

ИММУНОГЕННЫЕ И ТОКСИЧЕСКИЕ ЭФФЕКТЫ ЭНДОТОКСИНА E. COLI ПРИ ШОКОГЕННОЙ МЕХАНИЧЕСКОЙ ТРАВМЕ В ЭКСПЕРИМЕНТЕ

Беловолова Р.А.

НИИ Клинической иммунологии РостГМУ, Ростов-на-Дону, Россия

Травматический шок и посттравматический синдром характеризуются фазностью развития. Стадию необрати-

мых изменений связывают с эндотоксинемией (Кулагин В.К., 1978 г.). Эндотоксины *E.Coli* в физиологических условиях играют существенную роль в формировании антиэндотоксиновой резистентности организма. *E.Coli*, являясь облигатным условно патогенным представителем кишечной микрофлоры, в силу своей иммуногенности поддерживает фоновый уровень антител, реагирующих с липополисахаридом (ЛПС), общим структурным элементом клеточной мембраны *E.Coli* и других грамотригативных бактерий. Взаимодействие Toll-рецепторов иммунокомпетентных клеток с ЛПС активирует факторы врожденного иммунитета. Токсические эффекты ЛПС, обусловленные наличием в нем липида А, проявляются внутрисосудистым диссеминированным свертыванием крови (Кубатиев А.А. и др., 1989 г.), что формирует терминальную стадию шока.

Цель исследования. Определить уровень антител (Ат), реагирующих с гликолипидом А *E. Coli* для выяснения роли эндотоксина (Э) грамотригативных бактерий в формировании антиэндотоксиновой резистентности организма и защитно-приспособительных реакций врожденного и адаптивного иммунитета при травме.

Материал и методы исследования. Травматический шок моделировался у 50 беспородных крыс по Кеннону. Посттравматический период прослеживался до 14 суток. Антитела к гликолипиду А Re-хемотипа *E.Coli* определяли в РПГА (эритроцитарный диагностикум был получен из НИИ вакцин и сывороток им. И.И.Мечникова). В контрольной серии (25 крыс) динамику титра Ат к гликолипиду А *E.Coli* изучали после внутрибрюшинного введения Э кишечной палочки из расчета 2 мг на 1 кг массы.

Результаты исследования. У интактных животных фоновое содержание антител к гликолипиду А было невысоким ($Ig - 1,07 \pm 0,25$). В первый час после травмы концентрация Ат к гликолипиду А *E.Coli* увеличивалась в 3 раза ($Ig - 3,42 \pm 0,09$) с полным исчезновением их через 3 часа. В посттравматическом периоде содержание Ат постепенно увеличивалось, достигая максимальных цифр ($Ig 3,20 \pm 0,21$) на 14 сутки. Обработка проб 2-меркаптоэтанолом подтверждала специфичность реакции и принадлежность этих антител к Ig класса М. Динамика титра антител косвенно отражала динамику уровня Э, эндотоксинсвязывающей способности сыворотки крови и свидетельствовала о развитии эндотоксинемии к 3 часам после травмирования. В контрольных экспериментах при введении Э *E.Coli* интактным крысам отмечалась аналогичное снижение титра Ат, реагирующих с гликолипидом А *E.Coli* в течение первых 3 часов, что подтверждало как развитие эндотоксинемии, так и эндотоксинсвязывающую активность антител при травматическом шоке. Кратковременное увеличение титра Ат, реагирующих с гликолипидом А *E.Coli* в первый час после травмы не обусловлено их синтезом de novo и относится к срочным защитно-адаптивным реакциям, направленным на связывание Э. Появление Ат к гликолипиду А на 3-и сутки ($Ig - 2,40 \pm 0,10$) и максимальное их накопление ($Ig - 3,20 \pm 0,21$) на 14-е сутки посттравматического периода, вероятно, отражает иммуногенный эффект действия Э.

Итак, у интактных животных в сыворотке крови обнаруживаются Ат к гликолипиду А *E.Coli*, синтез которых обусловлен постоянным присутствием *E.Coli* в кишечнике. Способность этих Ат реагировать с ЛПС *E.Coli*, вероятно, обеспечивает антиэндотоксическую защиту организма. Поскольку титр Ат невысок, этот механизм

антиэндотоксиновой защиты быстро истощается, что способствует накоплению Э в крови при патологических состояниях. Массивное накопление Э в крови, которое возникает в результате нарушения гемо-энтероцитарного барьера приводит к проявлению патогенных его эффектов.

ВЛИЯНИЕ ДЕФЕНСИНОВ НА КОМПЛЕМЕНТ-ЗАВИСИМЫЙ БАКТЕРИОЛИЗ

Берлов М.Н., Умнякова Е.С., Леонова Т.С., Модлая А.Е., Кокряков В.Н.

*ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины», Санкт-Петербург, Россия
Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия*

Введение. В реализации реакций врожденного иммунитета у человека и животных важную роль играют антимикробные пептиды, в частности, дефенсины, продуцируемые фагоцитами крови и эпителиальными клетками. Помимо собственно антимикробной активности дефенсины обладают широким спектром иммуномодулирующих свойств. В качестве одного из таких свойств можно рассматривать влияние дефенсинов на активацию системы комплемента. Литературные данные по этому вопросу немногочисленны и противоречивы. Было показано, что α -дефенсины (HNP 1-3), сорбированные в лунках полистиролового планшета способны активировать комплемент (Proh szka et al., 1997), в то же время, дефенсины HNP-1 и HBD-2 ингибировали комплемент при оценке его активности по лизису сенсibilизированных антителами эритроцитов (Van den Berg et al., 1998; Groeneveld et al., 2007; Bhat et al., 2007). Мы сочли важным изучить действие дефенсинов на активацию комплемента в модели, отражающей его роль в противомикробной защите, а именно – с клетками *Escherichia coli* в качестве мишени комплемента.

Цель. Целью работы было изучение влияния α -дефенсина HNP-1 и β -дефенсина HBD-2 человека на комплемент-зависимый лизис клеток *E. coli*, штамм ML-35p.

Методы. В качестве источника комплемента использовалась 5%-ная сыворотка крови здоровых доноров. Активатором и мишенью комплемента были клетки *E. coli* ML-35p, характеризующиеся конститутивной экспрессией β -галактозидазы и отсутствием галактозил-пермеазы. Индуцированный комплементом бактериолиз оценивался по возрастанию доступности хромогенного субстрата орто-нитрофенил- β -D-галактозида (ONPG) для β -галактозидазы. Гидролиз ONPG детектировали по увеличению поглощения пробы при 414 нм.

Результаты. По результатам нашей работы, оба исследованных дефенсина, HNP-1 и HBD-2, в концентрации 10 мкг/мл ускоряют активацию комплемента, приводящую к лизису клеток *E. coli*. В отсутствие дефенсинов 50%-ный гидролиз ONPG наблюдался примерно через 3 часа, а в присутствии дефенсинов – через 2,5 часа. Еще один антимикробный пептид человека, кателицидин LL-37, не оказывал влияния на этот процесс.

Заключение. Согласно полученным нами данным, дефенсины ускоряют комплемент-зависимый лизис клеток *E. coli*. Кажущееся противоречие с литературными данными об ингибировании дефенсинами лизиса эритроцитов комплементом может объясняться различным

средством дефенсинов к эритроцитам и бактериальным клеткам. Известно, что дефенсины эффективно сорбируются на поверхности бактериальных клеток, но слабо взаимодействуют с эритроцитами. Описанные в литературе и подтвержденные нами данные о способности дефенсинов формировать комплекс с белком С1q позволяют предположить, что они могут активировать комплемент по классическому пути независимо от антител. Таким образом, согласно нашей гипотезе, дефенсины способны функционировать не только как эффекторные, но и как рекогносцировочные, квазирецепторные факторы врожденного иммунитета, сорбируясь на поверхности бактериальных клеток и маркируя их для последующей атаки системой комплемента.

ОТВЕТ НАИВНЫХ CD31+ Т-ЛИМФОЦИТОВ НА СТИМУЛЯЦИЮ IL-7 И IL-15 IN VITRO

Блинова Е.А., Пашкина Е.А., Козлов В.А.

НИИФКИ, Новосибирск, Россия

Введение: Размер пула наивных лимфоцитов остается практически неизменным в течение жизни человека, не смотря на непрерывную стимуляцию клеток окружающими организм антигенами и драматическими изменениями лимфоэпителиальной массы тимуса с возрастом. Поддержание численности наивных Т-клеток обеспечивается процессами их образования в тимусе и гомеостатической пролиферации на периферии. Факторами выживания и гомеостатического контроля для наивных CD4+ и CD8+ клеток являются IL-7 и IL-15. По экспрессии CD31 Т-лимфоциты делят на «истинно» (недавно вышедшие из тимуса, CD31+) и центральные наивные клетки (CD31-). Негативная популяция образуется из CD31+ лимфоцитов, которые получили гомеостатический сигнал от комплекса МНС/аутологичный пептид. Однако с возрастом снижение CD31+ клеток не соответствует уменьшению содержания ТREC в них, что предполагает наличие пролиферации данной популяции с сохранением молекулы CD31. Поэтому целью данной работы было исследование экспрессии CD31 на Т-лимфоцитах в динамике клеточных делений *in vitro* при стимуляции IL-7 и IL-15.

Материалы и методы: Мононуклеарные клетки (МНК) выделяли из периферической крови условно-здоровых доноров (n=10), средний возраст 42±3,1 года. Часть выделенных клеток сразу метили моноклональными антителами к антигенам CD3, CD4, CD45RA и CD31, конъюгированными с флуорохромами FITC, PE, PerCP и APC соответственно. Остальные клетки окрашивали витальным красителем CFSE (4 мкМ) и культивировали в 24-луночных планшетах в полной среде (RPMI-1640, 10% FCS) в присутствии и отсутствии IL-7 и IL-15 в концентрации 2 млн клеток в мл. После 7 дней культивирования клетки собирали и окрашивали тем же набором моноклональных антител. Фенотипирование клеток осуществляли методом проточной цитофлуориметрии на клеточном анализаторе FACS Canto II (BD, США).

Результаты и обсуждение: Опытным путем была подобрана оптимальная концентрация гомеостатических цитокинов (50 нг/мл). В ответ на стимуляцию IL-7 и IL-15 Т-лимфоциты совершали в среднем 3-4 деления. При этом IL-7 вызывал пролиферацию как CD4+, так и CD8+ клеток, а IL-15 — преимущественно CD8+ лимфоцитов. Добавление обоих цитокинов приводило к суммирова-

нию оказываемых ими эффектов. До культивирования число CD4+ лимфоцитов в среднем составило 37,3±2,7%, а CD8+ - 19,8±5,0%; тогда как оно достоверно повысилось после культивирования с IL-7 (53,8±2,8% и 25,9±1,6%) и с IL-15 (45,2±3,1% и 27,2±2,6%). При совместном культивировании с IL-7 и IL-15 количество CD4+ и CD8+ клеток увеличилось до 43,9±3,0% и 28,6±3,1% соответственно. В отсутствие гомеостатических цитокинов Т-клетки практически не пролиферировали (в среднем 1-2%) и их соотношение достоверно не отличалось от такового до культивирования. Число наивных CD31-позитивных Т-лимфоцитов до культивирования составило 38,9±5,2% для CD4+ клеток и 72,2±4,3% для CD8+ клеток. Достоверных отличий по количеству CD4+31+ и CD8+31+ лимфоцитов до и после культивирования в присутствии и отсутствии IL-7 и IL-15 не было выявлено. Число пролиферирующих в ответ на IL-7 CD4+ клеток составило 22±5,5%, на IL-15 — 9,8±2,0%, на IL-7 вместе с IL-15 — 31,2±7,0%. Число пролиферирующих в ответ на IL-7 CD8+ клеток составило 35±5,5%, на IL-15 - 49±6,8% и совместно на IL-7 и IL-15 - 61±6,3%. Аналогичное число отвечающих на стимуляцию клеток было выявлено и для субпопуляций CD4+31+ и CD8+31+ лимфоцитов. При этом 25±5,4% наивных CD4+45RA+ клеток и 35±7,6% наивных CD8+45RA+ клеток пролиферировали в ответ на IL-7, 13±3,9% и 53±10,8% — в ответ на IL-15, 39±10,0% и 67±10,3% - в ответ на IL-7 и IL-15 соответственно. Наибольшее количество клеток среди пролиферирующих Т-лимфоцитов совершило только одно деление, причем данный феномен наблюдался для всех исследованных субпопуляций.

Выводы: В ответ на стимуляцию IL-7 и IL-15 наблюдалась медленная пролиферация Т-клеток, при этом IL-7 вызывал пролиферацию как CD4+, так и CD8+ клеток, а IL-15 — преимущественно CD8+ лимфоцитов. Число наивных CD45RA+ лимфоцитов, отвечающих на стимуляцию, не совпадало с числом пролиферирующих CD4+ и CD8+ клеток, что указывает на пролиферацию клеток памяти. Число наивных CD4+31+ и CD8+31+ клеток, отвечающих на стимуляцию пролиферацией, было сопоставимо с таковым для CD4+ и CD8+ Т-лимфоцитов. Таким образом, не смотря на увеличение количества CD4+ и CD8+ лимфоцитов в процессе культивирования соотношение CD31+/CD31- клеток оставалось неизменным, что свидетельствует о пролиферации CD31-позитивных и CD31-негативных клеток с сохранением их фенотипа.

ИССЛЕДОВАНИЕ ГЕМОГЛОБИНОВОГО СПЕКТРА КОСТНОГО МОЗГА КРЫС В УСЛОВИЯХ РЕПАРАТИВНОЙ РЕГЕНЕРАЦИИ ПЕЧЕНИ

Бриллиант С.А., Юшков Б.Г.

ГАУЗ СО Институт медицинских клеточных технологий

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

Долгое время особое внимание ученых было сконцентрировано на исследовании гемоглобинового спектра периферической крови, не учитывая изменений изоформ костного мозга (КМ). В настоящее время остаётся до конца невыясненным вопрос о физиологическом смысле различий физико-химических свойств изоформ гемогло-

бина КМ и их роли в адаптации организма в условиях репаративной регенерации печени.

Целью нашей работы являлось изучение изменения белковых фракций гемоглобина в костном мозге после резекции печени.

Материалы и методы. Эксперименты проведены на крысах. Все животные были поделены на три группы. Животные 1-й группы служили контролем. Животным второй и третьей групп производили резекцию печени. Забор материала у животных второй группы осуществлялся через 4 ч после операции в деструктивно-реактивную фазу регенерации печени, а у животных третьей группы через 17 ч после операции в пролиферативную фазу. Репаративную регенерацию печени вызывали удалением 2/3 массы органа - частичной гепатэктомией по Higgins, Anderson. Для определения соотношения между фракциями гемоглобина использовали метод электрофореза в полиакриламидном геле. Для электрофореза гемоглобина была использована система гелей № 1 по Г. Мауреру. Статистическую обработку данных проводили в программе «Statistica 6.0».

Результаты. После резекции печени происходит изменение отдельных фракций гемоглобина в КМ. Общее количество гемоглобина в КМ снижается на 4 ч после операции, однако, к 17 ч после резекции печени данный показатель возрастает в 2 раза в сравнении с интактной группой животных. Изменение гемоглобинового спектра: спустя 4 ч после резекции печени в КМ наблюдается понижение 2 и 3 белковых фракций гемоглобина, на фоне возрастания 1 и 6 изоформ в отличие от интактной группы. На 17 ч после операции отмечается возрастание - 1, 2, 5 и 6 белковых фракций гемоглобина. В периферической крови наблюдается схожая тенденция в соотношении и изменении белковых изоформ, как и в КМ. Общее число ретикулоцитов и клеток, несущих фетальные формы гемоглобина понижается на 4 ч, но спустя 17 ч после резекции печени, наоборот, значительно увеличивается в сравнении с контролем.

Описанные изменения на фоне снижения общего числа эритроцитов позволяют предположить, что после резекции печени происходит удаление крупных клеток и выход в кровяное русло мелких эритроцитов. Возможно, мелкие эритроциты способны проникать в регенерирующую печень в большем числе, чем более крупные клетки и все мелкие клетки в целом, проникнувшие в кровеносные сосуды регенерирующей печени содержат больше гемоглобина, чем эритроциты обычных размеров в этой ситуации. Немало важную роль в данном процессе играет, циркулирующий в крови эритропоэтин, который обеспечивает контроль дифференцировки клеток эритроидного ряда и участвует в поддержании постоянного уровня циркулирующих эритроцитов.

Заключение. Таким образом, изучение гемоглобинового спектра КМ крыс в условиях репаративной регенерации печени показало, что наиболее преобладают 1,5 и 6 белковые фракции, которые более адаптированы к функционированию при регенерации печени. В первые сутки репаративной регенерации печени происходит смена эритроцитарной популяции, которая проявляется в увеличении интенсивности эритропоэза в костном мозге.

ВЛИЯНИЕ ГАЛЕКТИНОВ НА ДИФФЕРЕНЦИРОВКУ И ФУНКЦИОНАЛЬНУЮ АКТИВНОСТЬ Th-ЛИМФОЦИТОВ IN VITRO

Васильева О.А., Прохоренко Т.С., Зима А.П., Новицкий В.В.

ГБОУ ВПО СибГМУ Минздрава России, Томск, Россия

Введение. Дизрегуляция процессов дифференцировки и апоптоза CD4+-лимфоцитов является патогенетическим фактором многих социально-значимых заболеваний. Одним из быстро развивающихся направлений науки является гликобиология, изучающая лектин-углеводные взаимодействия. В качестве перспективных регуляторов иммунного гомеостаза в данной работе рассматриваются эндогенные белки семейства лектинов - галектины. **Цель работы:** установить молекулярные механизмы регуляторного влияния галектинов 1-го и 3-го типов на дифференцировку и функциональную активность Th-лимфоцитов здоровых доноров in vitro. **Материалы и методы.** Исследование проведено на лимфоцитах, выделенных методом градиентного центрифугирования из крови здоровых доноров (n=25), с дальнейшим культивированием в питательной среде с добавлением рекомбинантных галектинов-1 и -3 («RnDSystems», США). Для создания in vitro условий, близких к естественным, использовали моноклональные активирующие антитела - анти-CD3/анти-CD28 («BD Pharmingen™», США). **Результаты.** Впервые выявлено, что действие галектина-1 in vitro на активированные CD4+-лимфоциты приводит к увеличению экспрессии мРНК транскрипционных факторов дифференцировки Th2-лимфоцитов (Gata-3) и регуляторных T-лимфоцитов (FoxP3) на фоне снижения экспрессии мРНК транскрипционных факторов дифференцировки Th1-лимфоцитов (Tbet) и Th17-лимфоцитов (RORc). Установлена способность рекомбинантного галектина-1 повышать количество и функциональные свойства T-регуляторных клеток, увеличивать содержание основного транскрипционного фактора дифференцировки T-регуляторных лимфоцитов (Foxp3), определяющего их супрессорные свойства. Обнаружено, что рекомбинантный галектин-3 стимулирует дифференцировку и функциональную активность Th2 и Th17 лимфоцитов при одновременном угнетении активности Th1 и регуляторных T-клеток. Установлено, что галектины -1 и -3 оказывают дозозависимое проапоптотическое действие на лимфоциты, характеризующееся увеличением количества клеток с деполаризованной митохондриальной мембраной, снижением количества антиапоптотического белка Bcl-2 и увеличением содержания проапоптотического белка Bax. **Заключение.** Проведенные эксперименты свидетельствуют о том, что использование галектинов позволяет избирательно управлять дифференцировкой, функциональной активностью и программированной гибелью отдельных субпопуляций CD4+-лимфоцитов. Применение галектинов и ингибиторов их активности - это современный фармакологический подход для лечения иммунозависимых заболеваний. **Благодарности:** Исследование выполнено при финансовой поддержке Совета по грантам Президента Российской Федерации (№ НШ-4184.2014.7, СП-375.2015.4).

IL-10 и Vreg ПРИ ИММУННОМ ОТВЕТЕ НА Т-НЕЗАВИСИМЫЕ АНТИГЕНЫ

Гаврилова М.В., Снегирева Н.А., Сидорова Е.В.

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

Введение. Недавно показано, что существуют не только Т, но и В регуляторные клетки — Vreg, обладающие фенотипом CD5+CD11d. Их регуляторные функции в значительной степени обусловлены секрецией цитокина IL-10. Влияние IL-10 на гуморальный иммунный ответ практически не изучено. Неизвестно, продуцируют ли Vreg одновременно с синтезом IL-10 иммуноглобулины (ИГ), как IL-10 влияет на функциональную активность разных популяций В клеток и т.д.. Исследования такого рода удобно проводить в системе *in vitro*. Это, однако, затрудняется чрезвычайно низким количеством Vreg (1-3% В клеток селезенки). Ранее нами была разработана модельная система, позволяющая минимизировать количества В-1 лимфоцитов при изучении их взаимодействий с другими клетками *in vitro*. В этой системе необходимая клеточная плотность создается за счет спленоцитов мышей линии СВА/N, не имеющих В-1 клеток. В настоящей работе такая модельная система использовалась для изучения влияния IL-10 на иммунный ответ В-1 и В-2 клеток при ответе на Т независимые антигены 1-го и 2-го типов (ТН-1 и ТН-2 АГ).

Материалы и методы. В-1 и В-2 лимфоциты выделяли из перитонеальной полости и селезенки (соответственно), мышей линии СВА методом иммуномагнитной сепарации. Клетки смешивали со спленоцитами мышей СВА/N в соотношении 1:9. В качестве ТН-1 АГ использовали липополисахарид (ЛПС) *E. coli*, а в качестве ТН-2 АГ — $\alpha(1\rightarrow3)$ декстран (Декс) *L. mesenteroides* и поливинилпирролидон (ПВП). Клетки инкубировали в полной среде в течение 4-х дней с АГ или без них; IL-10 вносили в культуру в дозе 50 нг/мл. Функциональную активность В лимфоцитов оценивали по числу антитело- и ИГ-образующих клеток (АОК и ИГОК, соответственно) в культурах с помощью ELISPOT.

Результаты. Добавление ЛПС (1 нг/мл) в культуру клеток индуцировало как специфический, так и поликлональный иммунный ответ. Число АОК в культурах спленоцитов мышей СВА/N возрастало с $15/10^6$ до $138/10^6$, а в смешанных с В-2 клетками культурах — с $37/10^6$ до $131/10^6$. Число ИГОК увеличивалось ~ в 6 и 5 раз, соответственно. Внесение в культуры IL-10 одновременно с ЛПС в большинстве случаев снижало как количество АОК, так и количество ИГОК. Так в культуре спленоцитов мышей линии СВА/N число АОК уменьшалось на 47%, а число ИГОК — на 80%. В культурах, содержащих В-2 лимфоциты, количества АОК и ИГОК снижались на 42% и 75%, соответственно. Таким образом, IL-10 оказывал сильное угнетающее действие на ответ В-2 клеток на ТН-1 АГ (В-1 клетки не исследовались, т.к. они под действием ЛПС сами синтезируют IL-10).

На следующем этапе исследовали влияние IL-10 на иммунный ответ, индуцируемый ТН-2 АГ. Внесение Декс и ПВП (10 нг/мл) в культуру с В-1 лимфоцитами мышей линии СВА индуцировало специфический иммунный ответ: число АОК возрастало с $117/10^6$ до $251/10^6$ и с $529/10^6$ до $1012/10^6$ клеток, соответственно. Число ИГОК под действием Декс возрастало не более чем на 20%, добавление ПВП приводило к увеличению их числа на 45%. Внесение IL-10 в культуры с ТН-2 АГ в большинстве опы-

тов снижало количество АОК. В случае с Декс число АОК снижалось на 61%, а в случае с ПВП — на 46%. Таким образом, специфический иммунный ответ на ТН-2 АГ IL-10 угнетал. На образование ИГОК он действовал по-разному. При добавлении IL-10 в культуру с Декс число ИГОК практически не менялось (снижалось ~ на 10%), а при добавлении в культуру с ПВП число ИГОК снижалось на 70%. Причина различий неясна.

Для изучения Vreg необходимо выделять их в чистом виде. Для этого использовали Regulatory B cell isolation kit (Miltenyi Biotec). В Vreg, выделенных из неактивированных клеток перитонеальной полости и селезенки мышей СВА содержалось 11% и 3.5% В клеток, синтезирующих IL-10; при выделении Vreg из активированных клеток (обработка ЛПС, форбол-12-миристинат-13-ацетатом и йономицином) соответствующие показатели составляли 96% и 70%. В культурах, обогащенных активированными Vreg, наблюдалось увеличение (в 7-10 раз) числа клеток, продуцирующих IgM, по сравнению с таковым в культурах неактивированных Vreg. Так в миллионе перитонеальных активированных Vreg было выявлено 109600 IgM-продуцентов (против 15 500 IgM-продуцентов в контроле), что составило ~ 11%. Чистота субпопуляции активированных Vreg клеток при этом равнялась 96%. Это позволяет заключить, что определенная часть Vreg клеток одновременно синтезируют и ИГ, и IL-10.

Заключение. 1) IL-10 угнетает иммунный ответ В-2 лимфоцитов на ТН-1 АГ и ответ В-1 клеток на ТН-2 АГ; 2) Vreg клетки способны одновременно синтезировать ИГ и IL-10.

ВЛИЯНИЕ ГРАНУЛОЦИТАРНО-МАКРОФАГАЛЬНОГО КОЛОНИЕСТИМУЛИРУЮЩЕГО ФАКТОРА (GM-CSF) НА ЦИТОКИНОВУЮ ПРОДУКЦИЮ Т-ЛИМФОЦИТОВ

Газатова Н.Д., Малащенко В.В., Шмаров В.А.,
Меняйло М.Е., Мелашенко О.Б., Годосенко Н.М.

Центр медицинских биотехнологий БФУ им. И. Канта,
Калининград, Россия

Введение. Гранулоцитарный -макрофагальный колониестимулирующий фактор (GM-CSF, Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor) играет важную роль в формировании воспалительных реакций. Он продуцируется Т-клетками, макрофагами, эндотелиальными клетками и фибробластами. Считается, что основные иммунологические эффекты GM-CSF связаны с его влиянием на клетки моноцит/макрофагального ряда. Вместе с тем, показано, что рецепторы к GM-CSF могут экспрессироваться на Т-лимфоцитах. Однако прямые эффекты GM-CSF на Т-клеточные функции не охарактеризованы.

Цель. Оценить эффекты GM-CSF на продукцию Т-клетками интерлейкина 17 (IL-17, interleukin-17), интерферона-гамма (IFN γ , interferon- γ), IL-2 и IL-4.

Материалы и методы. CD3+ Т лимфоциты выделяли из мононуклеарных клеток здоровых доноров (2 мужчин и 2 женщины, средний возраст 31,5 +2,3 года) методом позитивной магнитной сепарации. Выделенные Т-лимфоциты культивировали в бессывороточной среде TexMACS™ Medium research grade (Miltenyi Biotec) с частями конъюгированными с антителами к CD3, CD 2 и CD28 (T cells activation/expansion kit, Miltenyi Biotec) или без них в течение 48 ч. В опытные пробы был добавлен GM-CSF (Human GM-CSF, research grade, Miltenyi Biotec) в концентрации 0,1, 1,0 и 10,0 нг/мл. Уровень ци-

ТАБЛИЦА. СОДЕРЖАНИЕ ЦИТОКИНОВ В Т-КЛЕТОЧНЫХ СУПЕРНАТАНТАХ (К ТЕЗИСАМ ГАЗАТОВОЙ Н.Д. И ДР.)

Условия культивирования	Содержание цитокина (M+m, пг/мл.)			
	IL-17	IFN γ	IL-2	IL-4
GM-CSF(0,1 нг/мл) + активатор	0	60,2+8,36	278,9+82,4*	0
GM-CSF (1 нг/мл)+ активатор	0	64,8+5,28	252,8+62,3*	0
GM-CSF (10 нг/мл) + активатор	3,9+0,99	287,4+98,6*	286,3+72,4*	1,22+0,03*
GM-CSF (10 нг/мл) + среда	0	0	0	0
Активатор	3,9+0,91	73,7+8,3	432,5+89,1	3,1+1,02
Среда	0	10,5 +2,31	0	0

Примечание: * $p < 0,05$ в сравнении с пробой с одним активатором

токинов в клеточных супернатантах оценивали методом иммуоферментного анализа (ИФА) с использованием коммерческих тест-систем (Вектор-Бест, Россия).

Результаты. Как показано в таблице, GM-CSF в концентрации 0,1 нг/мл и 1 нг/мл снижал продукцию IL-17 активированными Т-клетками до неопределяемых значений. При концентрации GM-CSF 10 нг/мл этот эффект отсутствовал. В то же время, GM-CSF, добавленный к клеткам в максимальной дозе, усиливал продукцию IFN γ . Во всех исследуемых концентрациях, GM-CSF оказывал значимый супрессивный эффект на Т-клеточную продукцию IL-2 и IL-4.

Выводы. GM-CSF может оказывать разнонаправленное влияние на продукцию Т-клетками провоспалительных и противовоспалительных цитокинов. Эффекты GM-CSF на функции Т-клеток могут быть зависимыми от его концентрации в среде.

ОСОБЕННОСТИ ИММУНОЛОГИЧЕСКОЙ РЕАКТИВНОСТИ НА РАЗЛИЧНЫХ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ МОДЕЛЯХ ПСИХОЭМОЦИОНАЛЬНЫХ СОСТОЯНИЙ

Геворгян М.М., Альперина Е.Л., Идова Г.В.

НИИФФМ, Новосибирск, Россия

В настоящее время особое внимание привлекает вопрос о влиянии эмоциональных факторов и функционального состояния мозга на иммунологическую реактивность. В связи с этим, все большее значение приобретает поиск адекватных экспериментальных моделей на животных, позволяющий провести более полный анализ психонейроиммунных взаимоотношений при воздействиях, связанных с социальным стрессом и состояниями, близким психопатологиям человека.

Цель исследований: Проанализировать субпопуляционный состав и иммунологическую реактивность при экспериментальном моделировании субмиссивного, депрессивно-подобного и тревожного состояний.

Материалы и методы: Опыты проведены на мышах линий CBA/Lac, C57Bl/6J, ASC/Icg (Antidepressant sensitive catalepsy) с повышенной предрасположенностью к катаlepsии и выраженным депрессивно-подобным поведением и крысах Вистар. Формирование субмиссивного или депрессивно-подобного поведения у мышей C57Bl/6J осуществлялось методом дистантного сенсорного контакта. Крысы линии Вистар были разделены по анализу поведения в приподнятом крестообразном лабиринте на высоко- и низкотревожных. На 4 день у мы-

шей и 5 день у крыс после иммунизации эритроцитами барана (5×10^8) определяли количество антителообразующих и розеткообразующих клеток. Анализ субпопуляций CD3+, CD3+ 4+, CD3+ 8+, CD3+ 4+ 25+ лимфоцитов проводили на проточном цитофлуориметре «FACS Canto 2» («Becton Dickinson», USA).

Результаты исследований: На крысах линии Вистар нами показано, что у животных, демонстрирующих высокотревожное поведение, иммунный ответ был значительно ниже, чем у низкотревожных. Известно, что тревожность является компонентом депрессивноподобных расстройств. У мышей C57Bl/6J с субмиссивным и тревожно-депрессивноподобным поведением, выработанным в результате длительного 10- или 20-дневного социального стресса, отмечалось уменьшение в периферической крови процентного содержания CD3+ 4+ Т-клеток и, как следствие, снижение индекса иммунореактивности (соотношение CD3+4+ и CD3+8+ Т-клеток). При этом у животных с 20-дневным опытом поражений, состояние которых оценивается как выраженное тревожно-депрессивно-подобное на периферии происходят глубокие изменения субпопуляционного состава клеток - значительное снижение числа CD3+ Т-лимфоцитов (общая популяция Т-клеток), CD3+ 4+ 25+ Т-регуляторных лимфоцитов с рецепторами к ИЛ-2, а также CD3+ 8+ и CD3+ 4+ Т-лимфоцитов.

Интересно, что и в другой модели при наследственно детерминированном депрессивноподобном поведении у интактных мышей линии ACS отмечалось изменение в периферической крови процентного содержания CD3+ 4+ и CD3+ 8+ Т-клеток. На фоне повышения числа CD3+ 8+ Т-супрессорных/цитотоксических клеток у них снижалось процентное содержание CD3+ 4+ Т-хелперов, что приводило к снижению индекса иммунореактивности по сравнению с мышами родительской линии CBA без признаков депрессии. Мыши линии ACS характеризуются разнонаправленными изменениями соотношения CD3+ 4+ и CD3+ 8+ Т-клеток до и после иммунизации снижением индекса иммунореактивности у интактных животных и его увеличением в ответ на введение Т-зависимого антигена (эритроциты барана).

Таким образом, социальный стресс или генетически обусловленные нарушения приводят к формированию депрессивноподобного состояния, которое характеризуется своими особенностями перераспределения основных субпопуляций Т-клеток, что, в свою очередь, может оказывать влияние на иммунную реактивность при попадании в организм антигена.

ГИСТАМИНСОДЕРЖАЩИЕ КЛЕТКИ ПЕЙЕРОВЫХ БЛЯШЕК И ПРИЛЕЖАЩИХ К НИМ ВОРСИН КИШЕЧНИКА ЛАБОРАТОРНЫХ КРЫС В ХРОНИЧЕСКИХ ЭКСПЕРИМЕНТАХ С ПОСТУПЛЕНИЕМ СОЛЕЙ КРЕМНИЯ С ПИТЬЕВОЙ ВОДОЙ

Гордова В.С., Сергеева В.Е., Карышев П.Б.

ФГБОУ ВПО Чувашский государственный университет,
Чебоксары, Россия

Введение. В последнее время соединения кремния, ежедневное поступление которых в организм человека с питьевой водой, биологически активными добавками и разрыхлителями в составе пищевых продуктов практически не поддается контролю, все чаще вызывают интерес в плане влияния на функции иммунной системы. Непосредственным участником формирования адаптивного иммунного ответа является гистамин, рецепторы к которому имеются у подавляющего большинства иммунокомпетентных клеток. sdВзаимосвязь поступления в организм при вдыхании твердых соединений кремния с содержанием в тканях гистамина подробно рассматривается в литературе, однако вопрос, можно ли считать действие твердых и водорастворимых соединений кремния идентичным, остается открытым.

Цель работы – изучение обеспеченности гистамином пейеровых бляшек и прилежащих к ним ворсин тонкого кишечника лабораторных крыс на разных сроках длительного поступления в организм водорастворимого соединения кремния.

Материалы и методы. Объектами исследования явились подслизистые агрегированные лимфоидные узелки подвздошной кишки и прилежащие к ним кишечные ворсины 20 белых беспородных крыс-самцов. Контрольная группа – 10 крыс, получавших ad libitum стандартизованную питьевую воду, опытная – 10 крыс, получавших ad libitum стандартизованную питьевую воду с добавлением девятиводного метасиликата натрия в концентрации 10 мг/л в пересчете на кремний. Через 2 месяца были выведены из эксперимента по 5 крыс из каждой группы, через 9 месяцев – остальные.

Для выявления гистаминсодержащих клеток применялся люминесцентно-гистохимический метод Кросса, Эвена, Роста, с помощью цитоспектрофлуориметрии оценивали количественное выражение содержания гистамина.

Основные результаты. Гистаминсодержащие клетки стромы кишечных ворсин, прилежащих к лимфоидным узелкам, имеются в каждой ворсине среза, располагаются в центре ворсины в один ряд, содержат хорошо различимые субтильные гранулы, дающие ярко-желтое свечение. Интенсивность люминесценции гистамина в этих клетках и в их микроокружении для крыс контрольной и опытной групп не обнаруживает различий на обоих сроках эксперимента. Визуально гистологические препараты подслизистых агрегированных лимфоидных узелков подвздошной кишки крыс, получавших кремний 2 месяца, различий не обнаруживают. Поступление кремния в организм в течение 9 месяцев приводит к появлению лишь одного отличия: люминесцирующие клетки, заполняющие краевой лимфатический синус вокруг лимфоидных узелков, имеют большие размеры, в них, наряду с желтыми, появляются и оранжевые гранулы. На сроке 2 месяца интенсивность люминесценции гистамина в клетках гер-

минативных центров лимфоидных узелков крыс опытной группы, по сравнению с контрольной, возрастает в 1,2 раза как в самих клетках, так и в их микроокружении, и в 1,4 раза – в микроокружении люминесцирующих клеток краевых синусов ($p < 0,05$). На сроке 9 месяцев интенсивность люминесценции гистамина также выше у крыс опытной группы, однако она в большей степени возрастает в самих клетках, чем в их микроокружении: в 2,0 и 1,6 раза для клеток герминативных центров лимфоидных узелков и в 2,5 и 2,0 раза для клеток краевых синусов соответственно ($p < 0,001$).

Заключение. В гистаминсодержащих клетках пейеровых бляшек тонкого кишечника при поступлении с питьевой водой соединения кремния на сроке эксперимента 9 месяцев наблюдаются более выраженные качественные и количественные сдвиги в интенсивности люминесценции гистамина. Наши наблюдения подкрепляют концепцию, согласно которой действие гистамина является звеном в развитии адапционных реакций со стороны лимфоидных органов на поступление как твердых, так и водорастворимых, соединений кремния.

БИОЛОГИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ КОМПЛЕКСОВ ЛПС-ХИТОЗАН С РАЗЛИЧНОЙ МАКРОМОЛЕКУЛЯРНОЙ ОРГАНИЗАЦИЕЙ

Давыдова В.Н., Соколова Е.В., Ермак И.М.,
Соловьева Т.Ф.

Тихоокеанский институт биоорганической химии им.
Г.Б. Елякова ДВО РАН, Владивосток, Россия

Введение: Активный поиск препаратов, эффективных для борьбы с эндотоксемией, вызываемой грамотрицательными бактериями, ведется на протяжении многих десятилетий. Природный полисахарид хитозан и его производные обладают выраженной антиэндотоксической активностью. Связывая основной токсический компонент этих бактерий – липополисахарид (ЛПС, эндотоксин), эти ингибируют продукцию провоспалительных цитокинов и повышают неспецифическую резистентность организма к грамотрицательной инфекции. Однако молекулярные механизмы антиэндотоксического действия хитозана на клеточном уровне не изучены. Реализация биологического ответа макроорганизма на ЛПС осуществляется через сложный комплекс взаимодействий, механизм которых является сложным и многофакторным. Установлено, что даже незначительные вариации в структуре ЛПС, а, следовательно, и его надмолекулярной организации могут глубоко влиять на результирующую иммунологическую реакцию на эндотоксин.

Цели и задачи: В этой связи для понимания механизма снижения токсического действия ЛПС под влиянием хитозана представляется важным изучить иммунологические свойства эндотоксин-хитозановых комплексов различной стехиометрии и надмолекулярной структуры.

Материалы и методы: Цитокин-индуцирующую активность комплексов ЛПС из *Escherichia coli* (E-ЛПС) и *Yersinia pseudotuberculosis* (Y-ЛПС) с хитозаном (ХН) с молекулярной массой 130 кДа изучали *ex vivo* на клетках цельной крови человека с использованием ИФА. Влияние ЛПС и их комплексов на синтез активных форм кислорода (АФК) в клетках – методом проточной цитометрии. Для оценки связывания эндотоксинов с клетками крови

человека была разработана методика с использованием флуоресцентно-меченых производных ЛПС.

Основные результаты: Установлено, что образование комплекса ЛПС с ХН приводит к снижению цитокин-индуцирующей активности эндотоксина, которое не зависит от количества ХН в комплексе. Комплекс Е-ЛПС-ХН 4:1 в/в, имеющий максимальный размер и невысокое значение дзета-потенциала (-7 мВ) обладает наименее выраженной цитокин-индуцирующей активностью. Способность комплексов Е-ЛПС-ХН 4:1, Е-ЛПС-ХН 1:1 и Y-ЛПС-ХН 1:1 в/в активировать синтез АФК незначительно отличается от таковой для исходного эндотоксина. Для комплексов с высоким содержанием ХН (Е-ЛПС-ХН 1:7 и Y-ЛПС-ХН 1:5 в/в) зафиксировано увеличение уровня АФК в нейтрофилах. Установлено, что связывание комплексов с клетками иммунной системы зависит от их состава. Снижение способности комплексов ЛПС-ХН взаимодействовать с нейтрофилами и моноцитами по сравнению с исходным ЛПС наблюдалось для отрицательно заряженных композиций ХН с Е-ЛПС и Y-ЛПС. Комплексы с высоким содержанием ХН проявляли аномально высокую способность связываться с клетками.

Заключение: Снижение цитокин-индуцирующей активности ЛПС при его комплексировании с ХН, не связанное напрямую с увеличением содержания поликатиона в комплексах, а также резкое увеличение активности комплексов с высоким содержанием ХН, который обладает низкой активностью в индивидуальном состоянии, позволяет предположить, что модификация биологической активности ЛПС хитозаном связана с изменением надмолекулярной организации эндотоксина в составе комплекса с поликатионом.

Работа выполнена при поддержке РФФИ, проект № 13-04-00786.

СКОРОСТЬ ЗАЖИВЛЕНИЯ РАНЫ У ГОЛОТУРИИ EURENTACTA FRAUDATRIX ЗАВИСИТ ОТ КОЛИЧЕСТВА ЦИРКУЛИРУЮЩИХ ФАГОЦИТОВ И УРОВНЯ ИХ АПОПТОЗА

Долматова Л. С.

Тихоокеанский океанологический институт им. В.И. Ильичева ДВО РАН, Владивосток, Россия

У позвоночных установлено наличие двух субпопуляций/фенотипов макрофагов, М1 и М2, играющих разную роль на отдельных стадиях заживления ран (Rodero & Khosrotehrani, 2010). У голотурии *Eurentacta fraudatrix* выделено две фракции фагоцитов (аналоги макрофагов позвоночных), с разным уровнем фонового апоптоза (Dolmatov et al., 2004). Роль этих фракций, Ф1 и Ф2, в репарации повреждений покрова тела голотурий не изучена. Ранее из тканей некоторых видов голотурий был выделен экстракт (ЭГ), обладающий иммуномодулирующими свойствами (Долматова и Долматов, 2002). Целью данной работы явилось выявление зависимости скорости заживления раны поверхности тела от концентрации и уровня апоптоза циркулирующих фагоцитов Ф1 и Ф2 и влияния на нее ЭГ.

Материалы и методы. Стенку тела надрезали скальпелем. Измеряли длину раны через 0, 2 и 4 сут. Концентрацию клеток в целомической жидкости считали в камере Горяева. Разделение фагоцитов на фракции проводили центрифугированием в ступенчатом градиенте плотности фикола-верографина. Уровень апоптоза определяли окраской Hoechst 33342. ЭГ (0,3 мкг/г) вводили в полость

тела. Достоверность различий между группами определяли с использованием t-критерия Стьюдента.

Результаты и обсуждение. Концентрация целомацитов (большую часть которых составляют фагоциты) в целомической жидкости после нанесения раны снижалась через 2 суток на 33% по сравнению с контролем, что, по-видимому, связано с перемещением части клеток в поврежденные ткани. Через 4 суток она отличалась от контрольных значений незначительно. В Ф1 через 2 сут уровень апоптоза снижался на 32%, а в Ф2, напротив, возрастал на 29% по сравнению с контролем, что может свидетельствовать о различной роли Ф1 и Ф2 в репарации раны. При этом снижение уровня апоптоза в Ф1 может быть следствием снижения фагоцитирующей активности этих клеток в данный период. Рост же апоптоза в Ф2, по-видимому, связан с их большей чувствительностью к апоптозстимулирующим факторам, при том, что через 4 сут апоптоз возрастал по сравнению с контролем в обоих типах фагоцитов, на 50% в Ф1 и в 3,2 раза в Ф2. ЭГ ускорял заживление раны, максимально на 38%, через 4 суток, и вызывал снижение концентрации целомацитов в этот период на 70% по сравнению с контролем, по-видимому, стимулируя рекрутирование фагоцитов в ткани. При этом в Ф1 через 2 сут ЭГ снижал уровень апоптоза на 82%, а в Ф2 - на 29% по сравнению с контролем. Через 4 сут пентакан предотвращал рост апоптоза в Ф1. Ранее показано, что ЭГ влияет на уровень ИЛ-1 α -подобных веществ в Ф2 и модулирует синтез ИНФ- γ -подобных веществ в Ф1 и Ф2 противоположным образом (Долматова и др., 2013). По-видимому, ЭГ мог влиять на рекрутирование целомацитов и снижение апоптоза в обоих типах фагоцитов за счет модуляции синтеза провоспалительных цитокинов. Снижение апоптоза в циркулирующих Ф1 до нормальных значений через 4 сут, по-видимому, способствовало ускорению заживления. Выявленные изменения в количестве и активности фагоцитов в процессе заживления раны и противоположная динамика развития апоптоза в двух их фракциях в первые двое суток свидетельствуют о перспективности использования фагоцитов голотурий для моделирования механизмов участия субпопуляций макрофагов в репарации ран *in vivo*.

РОЛЬ ТИМУСА В ПРОЦЕССЕ ВОССТАНОВЛЕНИЯ Т-ЛИМФОЦИТОВ ПОСЛЕ ВОЗДЕЙСТВИЯ РАЗЛИЧНЫХ ПОВРЕЖДАЮЩИХ ФАКТОРОВ

Донецкова А.Д., Никонова М.Ф., Шарова Н.И., Комогорова В.В., Митин А.Н., Ярилин А.А.

ФГБУ «ГНЦ Институт иммунологии» ФМБА России, Москва, Россия

Оценка способности микроокружения тимуса поддерживать Т-лимфопоз после действия различных повреждающих факторов имеет принципиальное значение для предсказания последствий действия этих факторов на иммунную систему и организм в целом. Настоящее исследование основано на определении функциональной активности тимуса — его способности продуцировать Т-лимфоциты — путем выявления Т-рецепторных эксцизионных колец (TREC — T-cell receptor excision circles). Присутствие TREC в Т-клетках является свидетелем реаранжировки генов TCR, а их содержание на уровне популяции Т-клеток служит мерой содержания в ней особой фракции Т-клеток — недавних эмигрантов из тимуса (RTE — recent thymic emigrants).

Цель работы: определить вклад тимуса в процесс восстановления Т-лимфоцитов после действия различных повреждающих агентов (γ -лучей и глюкокортикоидов), отличающихся по характеру влияния на тимус.

Материалы и методы. Лимфопению индуцировали двумя способами: γ -облучением мышей линии С57BL/6 в дозах 0,5, 1, 2, 4, 8 Гр и введением им гидрокортизона в дозе 125 мг/кг. Исследование лимфоидных органов (тимуса, лимфоузлов, селезенки) проводили через 4, 8, 10, 12, 20, 30 после облучения (через 5, 10, 20 и 30 сут после введения гидрокортизона). Уровень ТREC определяли методом ПЦР «в реальном времени». Основным показателем содержания ТREC служил индекс ТREC/TCRA - отношение числа копий ТREC к числу копий TCRA. Статистическую обработку результатов проводили с использованием методов непараметрического анализа. Результаты представлены в виде: медиана (нижний квартиль-верхний квартиль).

Основные результаты. Минимальный уровень ТREC-содержащих клеток после облучения в тимусе определяется на 4 сут (индекс ТREC/TCRA составляет $11,6^* (9,5-15,8) \times 10^{-3}$ при $43,4 (24,4-65,8) \times 10^{-3}$ в контроле; $P=0,007$), затем наблюдается подъем этого показателя к 10 сут до $71,9^* (69,0-84,0) \times 10^{-3}$; $P=0,03$ (экстренная регенерация), повторное снижение к 20 сут - $20,8 (20,4-23,3) \times 10^{-3}$ (вторичная атрофия) и восстановление к 30 сут. При воздействии гидрокортизона - картина иная: так же, как и при облучении, минимальное значение ТREC наблюдается на 4 сут, в дальнейшем наблюдается их плавное нарастание к 30 сут. Следовательно, хотя конечные результаты восстановительных процессов после опустошения тимуса двумя разными агентами практически одинаковы, промежуточные события процесса регенерации очень сильно различаются.

В лимфатических узлах динамика ТREC после облучения в значительной степени соотносится с событиями восстановления тимуса. На 4 сут наблюдается максимальное снижение содержания ТREC в лимфоузлах. Развитие экстренной регенерации тимуса находит отражение в усилении эмиграции в лимфатические узлы ТREC-содержащих клеток, достигающей максимума на 12 сут - $25,6 (18,8-32,4) \times 10^{-3}$. К 20 сут показатели, характеризующие уровень ТREC, снижаются, а к 30 сут начинают приближаться к нормальным. Параллельно с падением уровня ТREC-содержащих клеток в тимусе (4 сут) происходит ослабление их выброса в селезенку, к 8 сут число ТREC-содержащих клеток в селезенке падает еще сильнее и достигает минимального уровня - $1,4^* (1,1-1,7) \times 10^{-3}$; $P=0,0005$. Усиление эмиграции ТREC-содержащих клеток в селезенку наблюдается на 20 сут после облучения. В дальнейшем происходит повторное снижение показателей, характеризующих содержание ТREC в селезенке. Следовательно, события, отражающие восстановление содержания ТREC в клетках лимфоузлов и селезенки после воздействия облучения, достаточно удовлетворительно соотносятся с событиями восстановления тимуса, причем сначала на изменения выхода RTE из тимуса реагируют лимфатические узлы, затем селезенка. После действия гидрокортизона усиленные выбросы ТREC-содержащих Т-клеток на периферию отсутствуют. При этом кривые, отражающие численность недавних эмигрантов из тимуса в лимфатических узлах и селезенке, практически совпадают: после спада на 5-10 сут они достигают уровня нормы и остаются на нем до конца наблюдения.

Заключение. Таким образом, нами показано существование двух вариантов восстановления тимуса и его взаимодействия с периферическим отделом иммунной системы: активный и пассивный. Активный вариант характеризуется резкими изменениями уровня клеток, содержащих ТREC, и наблюдается после действия генотоксических агентов, таких, как сублетальное облучение. Пассивный вариант характеризуется отсутствием выраженной восстановительной реакции, наблюдается после действия агентов, не обладающих генотоксичностью, таких, как гидрокортизон и облучение в низких дозах.

РОЛЬ БЕЛКА ОСТРОЙ ФАЗЫ ВОСПАЛЕНИЯ – ЦЕРУЛОПЛАЗМИНА ПРИ ДИСЛИПИДЕМИИ, ВЫЗВАННОЙ ХРОНИЧЕСКОЙ ФИЗИЧЕСКОЙ НАГРУЗКОЙ СУБМАКСИМАЛЬНОЙ МОЩНОСТИ

Ермолаева Е.Н.¹, Кривохижина Л.В.¹, Яковлева В.П.²

¹ ГБОУ ВПО «Южно-Уральский государственный медицинский университет»

² ФГОУ ВПО «Уральский государственный университет физической культуры», Челябинск, Россия

Дислипидемию при физических нагрузках не следует рассматривать только как патологический признак, довольно часто количественные и качественные сдвиги в липидном составе крови носят адаптивный характер, направленный на достижение высокой тренированности при минимизации физиологической цены. Безусловно, выбор лекарственных средств с целью коррекции проявлений дислипидемии и ее последствий требует дополнительного изучения. Можно предположить, что белки острой фазы воспаления, концентрация которых изменяется при интенсивной физической нагрузке, могут влиять на липидный профиль плазмы крови. Одним из таких белков является церулоплазмин, функции которого многообразны: главный антиоксидант плазмы крови; транспортер меди; участник метаболизма железа; регулятор окислительно-восстановительных процессов и другие. Исходя из выше изложенного, можно предположить, что церулоплазмин может быть связан с липидным обменом. **Цель исследования** - в условиях эксперимента определить влияние белка острой фазы - церулоплазмина на изменение липидного профиля крови при физической нагрузке субмаксимальной мощности.

Материалы и методы. Исследование проведено на 48 белых беспородных крысах. Все эксперименты выполнены согласно Европейской Конвенции по защите экспериментальных животных. Исследуемые животные были разделены на 3 группы: контрольная группа (интактные крысы), вторая - животные, подвергавшиеся хронической физической нагрузке субмаксимальной мощности (ХФН), третья - животные, которым вводили церулоплазмин и подвергли ХФН. Длительность эксперимента 21 день. Хроническую физическую нагрузку моделировали ежедневным плаванием в течение 30 минут при температуре воды - 32°C. Нагрузку увеличивали постепенно: первые семь дней животные ежедневно плавали без груза, следующие две недели животные плавали с грузом 2 % от массы тела. На 9, 15 и 21 день эксперимента, животные подвергались дополнительно максимальной физической нагрузке: плавали в течение 4-х минут с грузом массой 20% от массы тела. Церулоплазмин (НПО «Иммунопрепарат», Уфа) вводился на 1, 3 и 5 сутки в суммарной дозе

60 мг/кг веса. Внутрисердечный забор крови производился сразу после дополнительной физической нагрузки. Общий холестерол (ОХ), триацилглицеролы (ТГ) и холестерол липопротеинов высокой плотности (Х-ЛПВП) определяли с помощью наборов Ольвекс-диагностикум. Концентрацию холестерола липопротеинов низкой и очень низкой плотности (Х-ЛПНП и Х-ЛПОНП) последовательно рассчитывали по формуле Friedewald. Фосфолипиды (ФЛ) определяли прямым ферментативным колориметрическим методом с помощью наборов реагентов фирмы Sentinel (Италия). Результаты обрабатывались общепринятыми методами вариационной статистики, для определения достоверности различий средних величин применяли критерий непараметрической статистики Манна-Уитни (U); для оценки силы влияния использовали однофакторный дисперсионный анализ; определяли основную тенденцию изменений (тренд) и коэффициент аппроксимации.

Результаты исследования: Физическая нагрузка субмаксимальной мощности приводит к дислипидемии, проявлением которой является возрастание ФЛ, ТГ, ОХ и Х-ЛПОНП. Церулоплазмин, в целом, не нормализует содержание ФЛ в крови, количественное представительство которых по-прежнему остается на 9-21 сутки примерно в 2 раза выше контрольных значений. Введение церулоплазмينا приводит к снижению уровня ФЛ лишь на правах тенденции, но закономерный характер этого процесса подтверждается линией тренда и высоким коэффициентом аппроксимации $R^2=0,8742$. Введение церулоплазмина нормализует ТГ, ОХ, Х-ЛПОНП, Х-ЛПНП и Х-ЛПВП. Однофакторный дисперсионный комплекс показал достоверное влияние церулоплазмينا при хронической физической нагрузке субмаксимальной мощности на содержание ФЛ, ТГ, ОХ и Х-ЛПВП. Наиболее значимо церулоплазмин при физической нагрузке повлиял на общий холестерол и его вклад составил в среднем 44,4 % с минимальным размахом от 29,6 % до 59,28 %.

Таким образом, церулоплазмин частично способствует коррекции дислипидемии, вызванной хронической физической нагрузкой субмаксимальной мощности, а именно, к пределам нормальных значений возвращались значения триацилглицеролов, общего холестерола, и холестерола в липопротеинах; уровень фосфолипидов оставался на повышенных уровнях.

ПРИМЕНЕНИЕ ФИДЕРНЫХ КЛЕТОК, ЭКСПРЕССИРУЮЩИХ МЕМБРАНОСВЯЗАННЫЙ IL-21, ДЛЯ АКТИВАЦИИ И ПРОЛИФЕРАЦИИ НК-КЛЕТОК ЧЕЛОВЕКА

Ерохина С.А., Стрельцова М.А., Каневский Л.М., Коваленко Е.И.

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук, Москва, Россия

Короткое время жизни и пролиферации натуральных киллеров ограничивает возможности исследования молекулярных механизмов регуляции их активности и возможности терапевтического применения НК-клеток. В данной работе для стимуляции НК-клеток человека применены в качестве фидера облученные модифицированные клетки K562, экспрессирующие на своей поверхности мембраносвязанный IL-2 (mIL21). Проведено

сравнение экспрессии ряда рецепторов НК-клеток, опосредующих их цитолитическую активность, и жизнеспособности культур НК-клеток, полученных в моделях стимуляции, включающих 1) только указанные фидерные клетки, 2) данные фидерные клетки и IL-2, 3) только IL-2, 4) немодифицированные клетки K562 и IL-2. В работе использовали НК-клетки, выделенные из периферической крови здоровых добровольцев с помощью магнитной сепарации (Milteniy Biotech) либо путем клеточной сортировки (FACSVantage-DiVa, BD). Фенотип выделенных НК-клеток и его изменение в течение культивирования, в том числе экспрессию CD56, CD16, NKG2D, NKG2C, NKp44, HLA-DR, CD57, анализировали с помощью проточной цитометрии. Несмотря на то, что были выявлены значительные индивидуальные различия в экспрессии ряда маркеров НК-клетками, полученными от разных доноров, было выяснено, что стимуляция НК-клеток в различных моделях в целом приводит к увеличению экспрессии CD56, активирующего рецептора NKG2D, доли клеток, экспрессирующих рецептор NKp44 семейства NCR и HLA-DR-позитивных клеток и снижению доли CD57-позитивных клеток в культуре. При стимуляции НК-клеток IL-2 в комбинации с mIL21 нами было достигнуто наиболее значительное увеличение числа НК-клеток в образцах и максимальное увеличение экспрессии HLA-DR (около 80% в популяции). Стимуляция НК-клеток mIL21-экспрессирующими фидерными клетками в отсутствие IL-2 также приводила к увеличению доли клеток HLA-DR+, однако пролиферативная способность таких культур была снижена. С использованием mIL21-позитивных фидерных клеток нами получено и фенотипически охарактеризовано несколько коллекций клонов НК-клеток. Таким образом, применение для стимуляции натуральных киллеров человека фидерных клеток, экспрессирующих mIL21, может быть использовано для получения долгоживущих популяций и клонов НК-клеток, а также для изучения механизмов функционирования и сигналинга HLA-DR-положительных НК-клеток.

Работа выполнена при поддержке РФФИ (грант № 14-04-01842).

ИММУНОРЕГУЛЯТОРНЫЙ ПОТЕНЦИАЛ ТРОФОБЛАСТИЧЕСКОГО β -ГЛИКОПРОТЕИНА: ПЕРЕЗАГРУЗКА

Заморина С.А., Раев М.Б.

Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН, Пермь, Россия

Трофобластический β 1-гликопротеин (ТБГ) является одним из наиболее информативных маркеров формирования и функционирования фетоплацентарной системы. Впервые ТБГ был обнаружен и идентифицирован Ю.С. Татариновым в 1970-х. Иммуномодулирующие эффекты этого белка были продемонстрированы российскими учеными [Посисеева Л.В., Назаров С.Б., Ю.С. Татаринов «Трофобласт-специфический бета-гликопротеин в акушерстве и гинекологии», Иваново, 2004]. Невзирая на очевидный иммунорегуляторный потенциал ТБГ, в последние годы он почти не исследуется в этом аспекте. Прежде всего, это связано с отсутствием в открытом доступе нативного (не рекомбинантного) препарата ТБГ. В то же время, в последнее время были открыты новые субпопуляции клеток иммунной системы (Treg, Th17), а также продемонстрирован вклад индоламин-2,3-

диоксигеназы (IDO) в формировании иммунной толерантности, однако роль ТБГ в регуляции этих факторов на уровне клеток человека оставалась неизвестной.

Цель - изучение иммуномодулирующих эффектов нативного ТБГ человека на функционал Treg /Th17 и активность IDO моноцитов в системе *in vitro*.

Материалы и методы. Аутентичный нативный ТБГ человека получали авторским методом [Патент РФ № 2367449, Раев М.Б.]. Эффекты белка изучали в системе *in vitro*, используя концентрации, сопоставимые с таковыми при беременности (1, 10, 100 мкг/мл). Исследовали периферическую кровь небеременных женщин репродуктивного возраста. Для оценки уровня Treg (CD4+Foxp3+ и CD4+CD25^{bright}Foxp3+) МПК культивировали с ТБГ [ППС, 5% CO₂] в течение суток. Продукцию IL-10 оценивали иммуноферментным методом («Вектор-Бест») в 3-х сут. культуре CD4+-позитивных лимфоцитов, примированных в фенотип Treg [TGF-β, 5 нг/мл «GIBCO», anti-CD3/CD28 «Invitrogen», анти-IFN-γ и анти-IL-4 антитела (10 мкг/мл), «eBioscience», ППС, 5% CO₂]. Продукцию IL-17A оценивали по аналогичной схеме, в культуре CD4+-позитивных лимфоцитов, примированных в фенотип Th17 цитокинами IL-1β и IL-6 (по 10 нг/мл, «eBioscience»). Активность IDO в моноцитах определяли спектрофотометрически по изменению концентрации кинуренина в спонтанном и стимулированном (LPS, 100 нг/мл) варианте теста.

Результаты. Установлено, что ТБГ увеличивал количество адаптивных Treg в культуре (CD4+Foxp3+ и CD4+CD25^{bright}Foxp3+), осуществляющих супрессорные функции. В отношении функциональной активности Treg/Th17 показано, что ТБГ (10 и 100 мкг/мл) стимулировал продукцию IL-10 субпопуляцией Treg, одновременно угнетая продукцию IL-17A субпопуляцией Th17 (1, 10 и 100 мкг/мл). Установлено, что ТБГ не влияет на спонтанный уровень продукции кинуренина, однако в стимулированном LPS варианте теста реализуется индуцирующий эффект ТБГ во всех используемых концентрациях. Известно, что клетки, экспрессирующие повышенные уровни IDO, дополнительно способствуют генерации адаптивных Treg из CD4+CD25- лимфоцитов.

Таким образом, впервые на модели клеток человека продемонстрировано, что ТБГ вносит свой вклад в формирование иммунной толерантности в период беременности, повышая уровень Treg, и стимулируя продукцию IL-10 этой субпопуляцией Т-лимфоцитов, одновременно угнетая продукцию IL-17A субпопуляцией Th17. Важно отметить, что рекомбинантный ТБГ-1α на модели экспериментальных животных *in vivo* обладает аналогичным, опосредованным дендритными клетками, эффектом на уровень Treg и продукцию IL-10 [Martinez F.F. et al., 2013].

В более широком смысле, баланс Treg/Th17 и активность IDO имеет значение также при отторжении трансплантатов, процессах канцерогенеза и развитии аутоиммунных заболеваний. Помимо этого, можно предположить, что пониженные уровни ТБГ, которые связаны с определенными патологическими состояниями при беременности, в какой-то мере будут отменять необходимость для защиты плода иммуносупрессию, приводя к отторжению эмбриона. В то же время, есть данные, что у женщин с аутоиммунными заболеваниями (ревматоидный артрит, рассеянный склероз), отмечается улучшение состояния во время беременности, а повышенные уровни сывороточного ТБГ коррелировали с улучшением состо-

яния [Bebo V.F., Dveksler G., 2005]. Дальнейшее изучение влияния роли ТБГ в формировании иммунной толерантности может открыть возможности его применения в качестве лекарственного препарата, в частности, в терапии аутоиммунных заболеваний.

ПРЕНАТАЛЬНЫЙ «ИММУНОЛОГИЧЕСКИЙ СТРЕСС» ПРОГРАММИРУЕТ РАЗВИТИЕ НЕЙРОЭНДОКРИННОЙ СИСТЕМЫ

Захарова Л.А., Извольская М.С., Шарова В.С., Воронова С.Н.

ФГБУН Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН, Москва, Россия

Введение. В процессе развития иммунная и нейроэндокринная системы отвечают на воздействия различных стрессогенных стимулов. Значимый фактор риска, программирующий структуру и функции этих систем – перинатальный “иммунологический стресс”, вызванный вирусным или бактериальным инфицированием. Известно негативное влияние бактериального эндотоксина ЛПС, на развитие моноаминергической системы мозга. Индуцируя иммунный ответ у матери, ЛПС способен изменять концентрации про- и противовоспалительных цитокинов в различных органах плода, что служит основой возникновения у потомства иммунологических, психоневрологических и метаболических расстройств. Воздействия ЛПС в перинатальный период развития вызывают у половозрелых крыс уменьшение массы семенников, нарушения полового поведения, замедление половой зрелости. Однако данные о влиянии воспаления на развитие гипоталамо-гипофизарно-репродуктивной системы (ГГРС) плода и ее функционирование в половозрелом возрасте единичны.

Цель работы – исследование морфогенетического влияния ЛПС на развитие гонадотропин-рилизинг-гормон (ГРГ)-продуцирующей системы у крыс и мышей и функциональное состояние ГГРС у потомства. Задачи: влияние ЛПС на миграцию ГРГ-нейронов в гипоталамус у плодов, на уровень провоспалительных цитокинов в биологических жидкостях матери и плодов и экспрессию рецепторов к цитокинам, влияющих на их миграцию, а также на функционирование ГГРС у потомства крыс.

Материалы и методы. В экспериментах были использованы беременные мыши линии Balb/c и крысы Wistar. ЛПС (*E. coli*) вводили в/б крысам (18 мкг/кг) и мышам (45 мкг/кг) на 12-й день беременности. Динамику миграции ГРГ-нейронов и рецепторы к цитокинам оценивали иммуногистохимически. Уровень цитокинов определяли во временной динамике после введения ЛПС в крови, амниотической и спинномозговой жидкостях матери и плодов с помощью проточной цитометрии. Содержание ГРГ, гонадотропинов и половых стероидов оценивали с помощью РИА и ИФА. Статистическую обработку данных проводили с помощью непараметрического критерия Вилкоксона.

Основные результаты. Введение ЛПС самкам мышей или крыс на 12-ый день эмбрионального развития (Э12), в период образования предшественников ГРГ-нейронов, приводит к снижению темпов их интраназальной миграции в мозг. Возможным механизмом регуляции миграции ГРГ-нейронов является усиление синтеза провоспалительных цитокинов. Через 1,5-3 часа после введения ЛПС уровень провоспалительных цитокинов ИЛ-6, MCP-1,

ФНО α и ЛИФ увеличивался в биологических жидкостях матери и плодов: в крови и амниотической жидкости в 10-40 раз, в спинномозговой жидкости плодов в 2-10 раз. Незначительное увеличение их уровня сохранялось до 24 часов. На Э12-15 в назальной мезенхиме и на пути миграции ГРГ-нейронов на обонятельных и вомероназальных нервах выявлена экспрессия рецепторов к ЛИФ и ИЛ-6, соответственно. Пренатальное воздействие ЛПС приводило к гипофункции ГПРС у половозрелого потомства: снижению концентрации ГРГ в гипоталамусе, гонадотропинов в гипофизе, половых стероидов на периферии, а также к подавлению репродуктивной способности самцов и самок.

Заключение. Исходя из приведенных данных, активация иммунной системы матери бактериальным эндотоксином вызывает как у матери, так и плодов повышенную экспрессию провоспалительных цитокинов, подавляющих интраназальную миграцию ГРГ-нейронов в мозг. Появление ГРГ-нейронов в гипоталамусе с опозданием изменяет, по-видимому, формирование необходимых аксональных связей в ГПРС, что приводит к нарушениям в ее функционировании.

О ПОЛИФУНКЦИОНАЛЬНОСТИ ОЛИГОПЕПТИДА С ИММУНОРЕГУЛЯТОРНОЙ АКТИВНОСТЬЮ

Иванова В.П.

ФГБУН Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова Российской академии наук, Санкт-Петербург, Россия

Введение. Ранее нами был выявлен в структуре α -дефензинов позвоночных животных тетрапептид (ТП), стимулирующий митоген-индуцированную пролиферацию Т-лимфоцитов человека и процесс антителообразования у мышей при вторичном иммунном ответе к Т-зависимому антигену.

Цель данного исследования сводилась к характеристике новых биологических свойств ТП. Нас интересовал вопрос, способен ли ТП влиять на функциональную активность других клеточных типов, не относящихся к иммунной системе. В данной работе изучали действие ТП на клеточную адгезию.

Материалы и методы. В опытах использовали эпителиоподобную линию клеток СНО-K1 и эмбриональные фибробласты линии STO. Клетки культивировали в среде DMEM/F12 с добавлением 2 мМ глутамин, 50 мкг/мл пенициллина и стрептомицина, 10% эмбриональной телячьей сыворотки в атмосфере 5% CO₂ при 37°C. ТП в концентрации от 10⁻¹⁰ до 10⁻⁶ М вносили в клеточную суспензию непосредственно перед постановкой реакции. Клетки в 96-луночных планшетах инкубировали 1ч при 37°C в CO₂-инкубаторе. Прикрепившиеся клетки окрашивали кристаллическим фиолетовым. Распластывание клеток изучали на чашках Петри, в которые вносили клетки в питательной среде с добавлением 0.2% сыворотки. После добавления в клеточную суспензию ТП (кон-

центрации см. выше) культуру выдерживали 45 мин при 37°C. После фиксации клеток проводили подсчет клеток с распластанным и нераспластанным морфотипом.

Основные результаты. Показано, что ТП в широком диапазоне концентраций ускорял прикрепление и распластывание как эпителиоподобных клеток, так и фибробластов. Предполагается, что выявленный эффект связан с прямым или опосредованным действием ТП на активность интегриновых рецепторов, связывающих клетки с белками внеклеточного матрикса. Возможно, ТП посредством электростатических взаимодействий с определенными участками эктодоменов α -/ β -субъединиц интегринов может изменять конформацию рецептора, ускоряя его переход в активное состояние, и тем самым увеличивая скорость связывания интегринов с субстратом и последующий переход клетки к распластыванию.

Заключение. Исследованный ТП, участвующий в регуляции адгезивных свойств как эпителиоподобных, так и фибробластоподобных клеток, можно рассматривать в качестве перспективного фармакологического препарата, который можно использовать для обработки плохо заживающих ран, в том числе являющихся следствием химических или термических ожогов.

РОЛЬ АУТОАНТИТЕЛ К ГОМОЦИСТЕИНИЛИРОВАННОМУ АЛЬБУМИНУ

Изместьев С.В., Фефелова Е.В., Терешков П.П., Дутов А.А., Цыбиков Н.Н.

ГБОУ ВПО Читинская государственная медицинская академия, Чита, Россия

Введение. Повышенный уровень гомоцистеина является одним из факторов риска атеросклероза и тромбоза. Метаболит данной аминокислоты гомоцистеин-тиолактон способен образовывать связи с белками с модификацией последних. Имеются исследования, свидетельствующие о комплексировании самого гомоцистеина с белками плазмы крови и, особенно, с альбумином. Не исключено, что комплексы альбумина с гомоцистеином (гомоцистеинилированный альбумин) обладают аутоантигенными свойствами и вызывают образование аутоантител. Сформированные иммунные комплексы могут явиться дополнительным механизмом элиминации гомоцистеина, что и составило предмет нашего исследования.

Цель исследования: изучить уровень гомоцистеина и аутоантител к альбумину, модифицированному гомоцистеином у интактных крыс и крыс с иммунодефицитом (ИДС).

Задачи исследования:

1. Смоделировать иммунодефицит у лабораторных крыс.
2. Получить конъюгат сывороточного альбумина крысы с гомоцистеином (гомоцистеинилированный альбумин).
3. Определить уровень гомоцистеина в сыворотке крови интактных крыс и крыс с ИДС.

ТАБЛИЦА. ТИТР АУТОАНТИТЕЛ (МЕ(25-Й; 75-Й)) (К ТЕЗИСАМ ИЗМЕСТЬЕВА С.В. И ДР.)

Группа	До нагрузки	Через 6 часов после введения		После 9-дневного введения	
		гомоцистеина	тиолактона	гомоцистеина	тиолактона
Контроль	30(0; 30)	720(480; 960)**	960(960; 960)**	960(480; 960)**	0(0; 0)
ИДС	0(0; 0)	30(30; 30)*	30(30; 30)*	15(0; 30)*	0(0; 30)

Примечание: * $p < 0,05$ в сравнении с контролем; ** $p < 0,05$ в сравнении с уровнем до нагрузки

4. Оценить содержание аутоантител к гомоцистеинилированному альбумину в сыворотке крови у интактных крыс и животных с экспериментальным иммунодефицитом.

Материалы и методы. В эксперимент включены 40 крыс, средней массой 150 г, из которых у 20-ти вызывали ИДС, 20 – составили контрольную группу. ИДС получали путем внутрибрюшинного введения циклофосфана, подтверждали определением иммунограммы методом проточной цитометрии. В начале исследования у крыс забирали кровь из подключичной вены, затем 10-ти интактным и 10-ти крысам с ИДС ввели гомоцистеин в концентрации 100 мкмоль на 1 мл ОЦК. 10-ти интактным и 10-ти крысам с ИДС ввели гомоцистеин-тиолактон в той же концентрации. Через 6 часов кровь забирали вновь. Далее ежедневно вводили гомоцистеин и гомоцистеин-тиолактон в течение 9-ти дней на фоне введения цитостатика и интактным крысам, после чего осуществляли окончательный забор крови. Получение крысиного альбумина осуществляли ультрафильтрацией сыворотки крови с порогом разделения 100 КДа для отделения крупнодисперсных белков, а затем ультрафильтрацией с порогом 50 КДа – отделить белки меньшей молекулярной массы. Для получения гомоцистеинилированного крысиного альбумина гомоцистеин в концентрации 150 мкмоль/л инкубировали с 5% раствором альбумина 24 ч. при 4°C и 60 мин. при 37°C. Гомоцистеинилированный крысиный альбумин конъюгировали глутаровым альдегидом на эритроцитах, последние использовали в РПГА для определения титра аутоантител в полученных у экспериментальных животных образцах сыворотки. Уровень гомоцистеина определяли методом ВЭЖХ. Статистическую обработку выполняли в программе Statistica с использованием критерия Манна-Уитни, значимыми считались различия при $p < 0,05$.

Основные результаты. Уровень гомоцистеина (Ме (25-й; 75-й)) у интактных крыс до нагрузки составил 3,81 (3,03; 4,38) мкмоль/л, спустя 6 часов после введения – 2,92 (2,02; 2,99) ($p < 0,05$ по сравнению с уровнем до нагрузки), после 9-ти дневного введения – 4,24 (3,74; 5,52), что сопоставимо с исходной концентрацией. У животных с ИДС до нагрузки – 7,18 (6,61; 7,59) ($p < 0,05$ по сравнению с уровнем у интактных), через 6 часов после введения – 9,38 (7,65; 12,1) (что значимо выше по сравнению как с исходным уровнем, так и с аналогичным показателем в группе контроля), после 9-ти дневного введения – сопоставим с исходной концентрацией. Результат определения титра аутоантител представлен в таблице.

Заключение. У интактных животных обнаружено снижение уровня гомоцистеина после его введения на фоне возрастания титра аутоантител к гомоцистеинилированному альбумину, что свидетельствует о возможности иммунного механизма элиминации этого метаболита. У крыс с иммунодефицитом отмечается, напротив, возрастание концентрации гомоцистеина в сыворотке крови после его введения, на фоне общего снижения уровня аутоантител.

ИЗМЕНЕНИЯ УРОВНЯ Treg И Th17-ЛИМФОЦИТОВ У ПОТОМСТВА КРЫС С ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫМ ГЕСТАЦИОННЫМ ДИАБЕТОМ

Камышный А.М., Прозорова Т.М.

Запорожский государственный медицинский университет, Запорожье, Украина

Введение: Развивающаяся при гестационном диабете (ГД) внутриутробная гипергликемия способна влиять

на морфогенез органов иммунной системы, что, в свою очередь, может привести к нарушению формирования иммунологической толерантности к панкреатическим антигенам. Одним из перспективных направлений специфической профилактики СД является формирование оральной толерантности (ОТ) к инсулину, как основному β -клеточному антигену. В тоже время, ключевым сайтом для индукции ОТ являются брыжеечные лимфатические узлы (БЛУ), в которых происходит интенсивная активация наивных Т-лимфоцитов и их дифференцировка в субпопуляции эффекторных клеток. Важную роль в механизмах индукции ОТ играют субпопуляции супрессорных Т-регуляторных (Treg) и провоспалительных Th17-клеток, основными регуляторами образования которых являются соответственно транскрипционные факторы Foxp3 и ROR γ t.

Цель и задачи: Изучить особенности распределения Foxp3+ и ROR γ t+ лимфоцитов в БЛУ у потомства крыс с экспериментальным гестационным диабетом (ЭГД).

Материалы и методы: Исследования проводили на крысах линии Wistar. ЭГД моделировали путем однократного в/брюшинного введения стрептозотоцина в дозе 45 мг/кг на 15-е сутки датируемой беременности. Структуру популяции Treg и Th17-клеток изучали путем анализа гистологических срезов, окрашенных МКАТ к транскрипционным факторам Foxp3 и ROR γ t (Santa Cruz Biotechnology) с помощью компьютерной программы ImageJ (NIH, США). Изображение, получаемое на микроскопе PrimoStar (ZEISS) в ультрафиолетовом спектре возбуждения 390 нм (FITC) с помощью камеры AxioCam 5c (ZEISS) и пакета программ AxioVision 4.7.2 вводилось в компьютер. Изучали распределение Foxp3+ и ROR γ t+ лимфоцитов в корковом плато и мякотных тяжах БЛУ.

Результаты: У потомства крыс с ЭГД наблюдалось снижение общего количества Treg в морфофункциональных зонах БЛУ, отмечался дисбаланс Foxp3+ лимфоцитов отдельных классов при изменении концентрации транскрипционного фактора Foxp3 в иммунопозитивных клетках. Это сопровождалось увеличением суммарной плотности Th17-лимфоцитов в корковом плато в 1,5 раза ($p < 0,05$) у 1-месячного потомства крыс с ЭГД и в 2,4 раза ($p < 0,05$) у 6-месячного. Аналогичная динамика увеличения численности ROR γ t+ лимфоцитов отмечалась и в мякотных тяжах БЛУ.

Заключение: Выявленные изменения могут быть одними из факторов риска развития сахарного диабета у потомства.

ВЛИЯНИЕ НЕСТЕРОИДНЫХ ПРОТИВОВОСПАЛИТЕЛЬНЫХ ПРЕПАРАТОВ РАЗНЫХ ХИМИЧЕСКИХ ГРУПП НА ПРОДУКЦИЮ ФНО- α В СИНОВИАЛЬНОЙ СУМКЕ КРЫС

Кательникова А.Е.¹, Крышень К.Л.², Макарова М.Н.², Шабашова Н.В.¹

¹ ГБОУ ВПО СЗГМУ им. И.И. Мечникова

² ЗАО «Санкт-Петербургский институт фармации», Санкт-Петербург, Россия

Введение. Основой фармакотерапии артритов являются нестероидные противовоспалительные препараты (НПВП). Однако большое число экспериментальных и клинических наблюдений позволило сделать вывод, что большинство применяемых НПВП для лечения артритов, с одной стороны купируют болевой синдром и снимают

ТАБЛИЦА 1. УРОВЕНЬ ФНО- α В ЭКССУДАТЕ ВОЗДУШНОГО МЕШОЧКА (К ТЕЗИСАМ КАТЕЛЬНИКОВОЙ А.Е. И ДР.)

Параметры	Интактная	Контрольная	Индометацин	Мелоксикам	Кетопрофен	Целекоксиб
n	7	7	7	7	7	7
ФНО- α , нг/мл	0,0 \pm 0,00	6,6 \pm 0,38*	6,0 \pm 0,20*	6,8 \pm 0,42*	5,6 \pm 0,40*	7,4 \pm 0,63*
ФНО- α , %	0	100	91	103	85	112

Примечание - * - различия статистически значимы по сравнению с интактными животными ($p < 0,05$, ANOVA)

острую фазу воспаления, с другой стороны усиливают дегенерацию хряща, снижают метаболическую активность хондробластов и угнетают синтез протеогликанов. В настоящее время механизмы, ассоциированные с влиянием на хрящевую ткань до конца не известны, и их понимание является актуальной задачей современной фармакологии. Одной из гипотез, является существование у НПВП ЦОГ-независимых механизмов, связанных с регуляцией провоспалительного сигнального каскада и синтеза провоспалительных цитокинов, включая фактор некроза опухоли (ФНО- α).

Целью нашей работы являлась оценка влияния НПВП разных химических групп на провоспалительный цитокин ФНО- α на модели синовиальной сумки – «каррагениновый воздушный мешочек» у крыс.

Материалы и методы. Исследование выполнено на 42 аутобредных крысах самцах массой 180–200 г. Животных содержали в стандартных условиях в соответствии с Директивой 2010/63/EU Европейского парламента. Формирование воздушного мешочка осуществляли за шесть дней до начала введения исследуемых объектов путем двукратного подкожного введения в межлопаточную область спины экспериментальных животных воздуха. Острое воспаление индуцировали на шестой день. Для этого в полость мешочка вводили 2 мл 2% раствора λ -каррагенина (Sigma-Aldrich, США). Было выбрано введение препаратов в полость синовиальной сумки, что соответствует внутрисуставному введению НПВП в клинике. Интактным животным (группа 1) в полость воздушного мешочка вводили физиологический раствор. Контрольной группе животных (группа 2) в полость воздушного мешочка в объеме 1,0 мл стерильным шприцем за 1 час до введения раствора каррагенина вводили растворитель. НПВП: индометацин, мелоксикам, кетопрофен, целекоксиб в одной дозе 5 мг/кг вводили в полость воздушного мешочка по аналогичной схеме. Оценку действия препаратов проводили через 6 часов после инъекции каррагенина по анализу уровня ФНО- α в экссудате с помощью тест-системы производства «R&D Systems» (США). Статистическую обработку проводили с использованием программы «Statistica 6.0».

Основные результаты. Исследование показало, что в условиях острого воспаления на модели синовиальной сумки, НПВП при местном применении не оказали влияния на индукцию синтеза ФНО- α (таблица 1).

Заключение. Таким образом, отсутствие влияния НПВП на активацию провоспалительного цитокина ФНО- α индуцированную раствором λ -каррагенина, может являться одной из причин дегенерации хряща при лечении артритов препаратами. Полученные результаты требуют дальнейшего углубленного изучения влияния НПВП на основные медиаторы воспаления с целью выбора «безопасных» препаратов для основной терапии артритов.

МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ ИЗМЕНЕНИЯ ГЕПАТОЦИТОВ И ЭКСПРЕССИЯ ГЕНОВ ЦИТОКИНОВ В ПЕЧЕНИ САМЦОВ И САМОК КРЫС ВИСТАР ПРИ СИСТЕМНОМ ВОСПАЛИТЕЛЬНОМ ОТВЕТЕ

Козловская Г.В., Косырева А.М.

ФГБНУ «НИИ морфологии человека» РАМН, Москва

Проведено сравнительное исследование выраженности морфологических изменений и экспрессии генов провоспалительных цитокинов в печени самцов и самок крыс Вистар при синдроме системного воспалительного ответа, вызванного воздействием высокой дозы ЛПС (5 мг/кг). Через сутки после введения ЛПС в печени самцов выявлялись альтеративные и воспалительные изменения в виде очаговых некрозов, выраженной и распространенной дистрофии гепатоцитов, в просвете синусоидных капилляров и мелких вен определялся фибрин, стазы и сладжи. В те же сроки, в тех же условиях в печени самок, которым вводили ЛПС, наблюдались гораздо менее выраженные воспалительные изменения.

Для оценки в ткани печени уровня экспрессии генов противовоспалительных цитокинов ИЛ-1 β , ИЛ-6, рецептора CD14 и провоспалительного цитокина ИЛ-10 применяли полимеразную цепную реакцию с электрофоретической детекцией в агарозном геле. В качестве референсного гена использовали ген глицеральдегидфосфат дегидрогеназы.

Показано, что через 2 часа после введения ЛПС в ткани печени самцов наблюдалось резкое повышение активности генов провоспалительных цитокинов ИЛ-1 β , ИЛ-6 и рецептора CD14 с одновременным снижением экспрессии ИЛ-10. В то же время у самок ген ИЛ-1 β практически не индуцировался, экспрессия генов ИЛ-6 и ИЛ10 сохранялась без изменения, а ген CD14 супрессировался. При этом исходные контрольные значения экспрессии генов провоспалительных цитокинов у самок превышали контрольные уровни экспрессии этих генов у самцов.

СПЕЦИФИКА КИСЛОРОДОЗАВИСИМОГО ФАГОЦИТОЗА НЕЙТРОФИЛЬНЫХ ГРАНУЛОЦИТОВ ПРИ ВОЗДЕЙСТВИИ ШТАММОВ STAPHYLOCOCCUS AUREUS УСТОЙЧИВЫХ К МЕТИЦИЛЛИНУ

Коленчукова О.А.¹, Сарматова Н.И.²,
Кашникова Е.С.²

¹ «НИИ МПС», Красноярск, Россия

² Сибирский федеральный университет, Красноярск, Россия

Введение. Метициллин - резистентный стафилококк (MRSA)— любой штамм бактерии золотистого стафилококка, который устойчив к большой группе антибиотиков — бета-лактамов. MRSA адаптировался к выживанию в присутствии метициллина, диклоксациллина и окса-

циллина. Наиболее часто именно с ним связаны внутрибольничные (нозокомиальные) инфекции.

Цель и задачи. Оценка функциональной активности нейтрофильных гранулоцитов при воздействии штаммов *Staphylococcus aureus* устойчивых (MRSA) и чувствительных (MSSA) к метициллину.

Материалы и методы. Объектами исследования служили штаммы *Staphylococcus aureus* устойчивых (MRSA, n=20) и чувствительных (MSSA, n=20) к действию метициллина и нейтрофильные гранулоциты выделенные из венозной крови. Для выявления метициллинрезистентности *S. aureus* использовали метод скрининга на агаре. Для проведения скрининга использовали агар Мюллера-Хинтон, содержащий 4% NaCl и 6,0 мкг/мл оксациллина. Функциональную активность нейтрофильных гранулоцитов оценивали с помощью хемилюминесцентного метода по методу De Sole P. et al. (1983).

Результаты. В результате исследования хемилюминесцентной реакции нейтрофильных гранулоцитов в ответ на воздействие живой бактериальной культуры *Staphylococcus aureus* в зависимости от устойчивости к метициллину (MRSA и MSSA) были получены следующие результаты: выявлено увеличение времени выхода на пик, интенсивности хемилюминесцентной реакции и площади под кривой при воздействии MRSA и MSSA относительно спонтанной реакции. Также было установлено увеличение времени выхода на пик, интенсивности и площади под кривой, а также индекса активации при воздействии живой культуры MRSA относительно MSSA ($p < 0,001$). Нейтрофильные гранулоциты несут на своей поверхности широкий спектр рецепторов, часть из которых может взаимодействовать с неопсонизированными бактериями (CR- и Toll-рецепторы). Полисахаридная капсула, которая образуется у золотистого стафилококка, препятствует распознаванию рецептором CR1 нейтрофилов фрагментов C3-комплемента на поверхности *S. aureus*, что существенно снижает фагоцитоз, при этом прилипание и поглощение бактерии может происходить через CR3 рецептор, поскольку он обладает лектиноподобными свойствами и содержит поверхностные вещества, с помощью которых этот микроорганизм проникает внутрь клетки с образованием фаголизосомы. Известно, что люминол способен проникать внутрь клетки и регистрировать весь пул образования АФК. Установлено, что функциональная активность нейтрофилов значительно изменяется при стимуляции праймирующей дозой стафилококков относительно спонтанной реакции. При индукции бактериальной культурой нейтрофильных гранулоцитов в процесс фагоцитоза включаются CR3 или Toll-подобные рецепторы, поддерживающие восприятие неопсонизированных микробных объектов, вместе с тем, также имеет значение и, к какому виду принадлежат бактерии и степень ее вирулентности.

Заключение. Исследование хемилюминесценции нейтрофильных гранулоцитов в ответ на стимул в виде живых бактериальных культур (MRSA и MSSA) показало повышенную функциональную активность как в ответ на устойчивые бактериальные культуры стафилококка, так и на чувствительные штаммы. Следует отметить, что интенсивность кислородзависимого фагоцитоза была выше в ответ на MRSA, нежели чем на MSSA. Обращает на себя внимание, что степень активации ферментов нейтрофильных гранулоцитов, более выражена при контакте с MRSA, что коррелирует с бактерицидной способностью фагоцитов. Нужно заметить что штаммы MRSA имели большую степень вирулентности относительно

штаммов MSSA. Поэтому мы полагаем, что вирулентные штаммы золотистого стафилококка оказывают ингибирующее действие на активность ферментов кислородзависимой системы нейтрофилов. По видимому, это следует отнести к одному из эффектов вирулентности штаммов *Staphylococcus aureus*. Также, можно отметить, что у штаммов MRSA имеет место перестройка метаболизма и изменение клеточной стенки за счет выработки фермента β -лактамазы, который разрушает β -лактамовое кольцо большинства пенициллинов.

ВОССТАНОВЛЕНИЕ Т-КЛЕТОК ВТОРИЧНЫХ ЛИМФОИДНЫХ ОРГАНОВ ПОСЛЕ СУБЛЕТАЛЬНОГО ОБЛУЧЕНИЯ: ВКЛАД ТИМУСА И ГОМЕОСТАТИЧЕСКОЙ ПРОЛИФЕРАЦИИ

Комогорова В.В., Шарова Н.И., Донецкова А.Д., Литвина М.М., Никонова М.Ф., Митин А.Н., Ярилин А.А.

ФГБУ «ГНЦ Институт иммунологии» ФМБА России, Москва, Россия

Основные закономерности лучевого поражения и пострадиационного восстановления лимфоидных органов и популяций лимфоцитов в общих чертах были изучены несколько десятилетий назад. В настоящее время, опираясь на современные концепции механизмов гомеостаза Т-клеточного отдела иммунной системы и новые методы исследования, появилась возможность уточнить и обогатить эти знания. В восстановлении популяции периферических Т-лимфоцитов задействованы два механизма – тимопоэз и гомеостатическая пролиферация (ГП) Т-клеток. Роль тимуса в восстановлении популяции периферических Т-лимфоцитов мы оценивали по уровню экспрессии TREC (T-receptor excision circles) в лимфоцитах вторичных лимфоидных органов. TREC формируются в тимусе при перестройке TCR (T Cell Receptor) и не реплицируются при дальнейших делениях Т-клеток. Таким образом, уровень экспрессии TREC в периферических лимфоцитах отражает приток недавних эмигрантов из тимуса во вторичные лимфоидные органы. Вклад ГП оценивали по изменению процента Ki-67+ Т-клеток (Ki-67 – маркер пролиферации).

Целью работы было поставлено: определить вклад тимопоэза и ГП в регенерацию Т-клеточного пула вторичных лимфоидных органов после лимфопении, вызванной сублетальным облучением.

Материалы и методы. Лимфопению индуцировали γ -облучением мышей линии C57BL/6 в дозе 4 Гр. Исследование лимфоидных органов (лимфоузлов и селезенки) проводили через 4, 8, 10, 12, 20, 30 и 60 сут после облучения. Уровень TREC определяли методом ПЦР «в реальном времени». Показателем содержания TREC служил индекс TREC/TCRA. Процент пролиферирующих (Ki-67+) Т-клеток определяли методом проточной цитофлуориметрии. Статистическую обработку результатов проводили с использованием методов непараметрического анализа.

Результаты. Клеточность в лимфоузлах мышей на 4 сут после облучения (максимум опустошения) составила 3,1 % от исходного, в селезенке – 6,21%. Восстановление численности Т-клеток в лимфатических узлах и селезенке завершалось к 60 сут и характеризовалось непрерывностью регенерации, несмотря на пик экстренной регенерации и вторичной атрофии тимуса на 12 сут и 20 сут после облучения, соответственно. Данный же феномен в случае

периферических лимфоидных органов нашел свое отражение в наличии выраженного пика TREC-содержащих клеток на 12 сут в лимфоузлах и менее выраженного - на 20 сут в селезенке. Для лимфоузлов индекс TREC/TCRA на 12 сут составил $25,6 (18,8-32,4) \times 10^{-3}$ против $9,9 (7,3-12,5) \times 10^{-3}$ на 8 сут и $6,0 (5,4-7,7) \times 10^{-3}$ на 20 сут. В селезенке на 20 сут - $7,5 (5,9-7,7) \times 10^{-3}$ против $1,8 (1,0-2,4) \times 10^{-3}$ на 12 сут и $4,0 (3,6-5,4) \times 10^{-3}$ на 30 сут. Следовательно, сначала на изменения тимопоэза реагировали лимфатические узлы, а позже - селезенка. Кратковременность пика экстренной регенерации тимуса обуславливает несущественность вклада TREC-содержащих клеток в восстановление численности Т-лимфоцитов в данный период времени. Начиная с 20 сут и вплоть до полного восстановления численности Т-клеток на 60 сут после облучения, отмечалось постоянное повышение индекса TREC/TCRA, отражающее нормализацию функции тимуса.

Уровень ГП как в селезенке, так и в лимфатических узлах уже на 4 сут после облучения претерпевал значимый подъем. Пик пролиферации (в обоих случаях - около 30% Ki-67+) наблюдался в лимфатических узлах на 8 сут, в селезенке - на 20 сут после облучения. Эти сроки соответствовали разным фазам восстановления тимуса - соответственно началу экстренной и окончательной регенерации, когда приток клеток из тимуса минимален. Затем интенсивность ГП снижалась, одновременно с усилением тимопоэза. При тимэктомии ГП была недостаточно эффективной для полного восстановления пула периферических Т-клеток, скорее всего, ввиду исчерпания запаса наивных Т-клеток, способных к ГП. Кроме того, как следствие усиления ГП, было отмечено накопление потенциально опасных в отношении аутоиммунитета клеток с фенотипом Т-клеток памяти, о чем свидетельствовало повышение в ходе регенерации доли CD62L^{hi}CD44^{hi} клеток, слабо экспрессирующих молекулу CD49d, т.н. «суррогатных» клеток памяти, при этом содержание наивных Т-клеток (CD62L^{hi}CD44^{lo}) оставалось ниже уровня контроля до конца периода наблюдения (60 сут).

Заключение. На ранних стадиях восстановления Т-клеток после сублетального облучения преобладают механизмы ГП, обеспечивающие непрерывность регенерации в отсутствие нормального тимопоэза, с 20-х суток - тимопоэз, без которого восстановление периферического пула Т-клеток не является полным и сопровождается накоплением Т-клеток с фенотипом клеток памяти и, скорее всего, сужением Т-клеточного репертуара.

ЦИТОКИНОВЫЙ ПРОФИЛЬ СПЛЕНОЦИТОВ, СТИМУЛИРОВАННЫХ КОНКАВАЛИНОМ А, И УРОВЕНЬ ЛЕПТИНА В КРОВИ МЫШЕЙ F1 (C57BL/6 X DBA/2) ПРИ КОГНИТИВНОМ НАПРЯЖЕНИИ И В УСЛОВИЯХ ОБОГАЩЕННОЙ СРЕДЫ

Кондашевская М.В., Диатроптов М.Е.

ФГБНУ «Научно-исследовательский институт морфологии человека», Москва, Россия

Адаптивные реакции иммунной и эндокринной системы при когнитивном напряжении и в условиях обогащенной среды изучены недостаточно. Цель исследования - определить цитокиновый профиль спленоцитов, стимулированных конкавалином А, и уровня пептидного гормона лептина в крови мышей F1 (C57BL/6 x DBA/2) при когнитивном напряжении, связанном с вы-

работкой пищедобывательного поведения и воздействию обогащенной среды.

Эксперименты выполнены в осенне-зимний период на 40 мышах-самцах F1 (C57BL/6 x DBA/2), масса тела 20–22 г (питомник ПАМТН), которых содержали по 10 особей в отдельных клетках. Было сформировано 4 группы: 1 - животные, получавшие пищу и воду без ограничений (сытые, С); 2 - мыши, подвергаемые пищевой депривации в течение 23 ч (ПД); 3 - животные, которым на фоне ПД предлагалось сформировать пищедобывательное поведение - процесс, сопровождающийся когнитивным напряжением (КН-ПД); 4 - особи, которых на фоне ПД помещали в условия обогащенной среды (ОС-ПД). Длительность каждого опыта 10–13 мин, длительность эксперимента 15 сут. Для создания ОС был использован стандартный протокол (Sztainberg Y., Chen A., 2010). Для формирования КН-ПД, применяли методику выработки циклического пищедобывательного навыка в многоальтернативной лабиринтной среде, используя авторскую программу «Labirint» (Никольская К.А. и др., 1995). Применяя методы ИФА, определяли в сыворотке крови уровень лептина и кортикостерона. В супернатантах селезенки определяли концентрацию интерферона- γ (ИФН- γ), интерлейкина-2 (ИЛ-2), ИЛ-6 и ИЛ-10.

Все виды моделируемых нагрузок (ПД, КН-ПД и ОС) можно отнести к физиологическим, поскольку по нашим данным уровень кортикостерона в крови мышей на 15-е сутки воздействий не отличался от контрольных значений (группа интактных сытых животных). Условия используемой в нашей работе сложной поведенческой модели формирования пищедобывательного поведения (КН-ПД) характеризовались усилением выработки и секреции спленоцитами провоспалительных цитокинов (ИЛ-2, ИЛ-6 - в 2,2 и 3,9 раз по сравнению с С и ПД соответственно) на фоне снижения уровня гормона/цитокина, продуцируемого жировой тканью, лептина (в 1,7 раз по сравнению с С и в 1,3 раза - после ПД). В условиях обогащенной среды, отличающихся нарастанием психоэмоционального напряжения, обусловленного конкуренцией за захват предпочтительных территорий и объектов, содержание провоспалительных цитокинов в культуре спленоцитов, снижалось (ИЛ-2, ИЛ-6, ИФН- γ - в 3,8, 1,4 и 7,4 раза по сравнению с С и ПД соответственно), что сопровождалось повышением уровня лептина (в 1,2 раза по сравнению с С и в 1,4 раза - после ПД). Сочетание этих результатов с парадоксальным повышением уровня лептина в условиях обогащенной среды и снижением его содержания при когнитивном напряжении может указывать на то, что данный гормон вовлечен в процессы регуляции психоэмоционального состояния, обучения, памяти, а также иммунного ответа.

ПОЛОВЫЕ РАЗЛИЧИЯ МОРФОФУНКЦИОНАЛЬНЫХ ПРОЯВЛЕНИЙ И ИММУНОЛОГИЧЕСКИХ НАРУШЕНИЙ ПРИ СИНДРОМЕ СИСТЕМНОГО ВОСПАЛИТЕЛЬНОГО ОТВЕТА У НОВОРОЖДЕННЫХ КРЫС ВИСТАР

Косырева А.М., Макарова О.В.

ФГБНУ «НИИ морфологии человека», Москва, Россия

Смертность при сепсисе у взрослых лиц превышает 35% (Eevy M.M. et al., 2010), тогда как у новорожденных детей он встречается менее часто, и смертность не превышает 10% (Wu J.H. et al., 2009). Y.-J. Shin и соавт. (2009) показано, что неонатальный сепсис чаще встречается

у мальчиков. В отличие от сепсиса в репродуктивном возрасте при сепсисе у новорожденных отмечается низкий уровень генерации свободных радикалов кислорода и азота, а также продукции провоспалительных цитокинов (Spasojević I. et al., 2012). Однако особенность воспалительных реакций и иммунологических нарушений при сепсисе у новорожденных в зависимости от пола не изучены. Поэтому целью исследования была оценка морфофункциональных проявлений и иммунологических нарушений при синдроме системного воспалительного ответа у новорожденных крыс Вистар.

Исследования проведены на самцах и самках двухдневных крыс Вистар (n=46), массой тела 10-12 гт. Синдром системного воспалительного ответа (ССВО) моделировали внутрибрюшинным введением ЛПС *E.coli* штамма 026:V6 («Sigma», США) в высокой дозе 15 мг/мл. Животных выводили из эксперимента передозировкой диэтилового эфира на 1-е сут после введения ЛПС. В сыворотке крови методом твердофазного ИФА оценивали содержание кортикостерона (IBL, Германия), общего тестостерона (DVC, Канада), эстрадиола (Cusabio, Китай) и прогестерона (DVC, Канада), трансформирующего ростового фактора- β (TRF- β) (eBioscience, Австрия), с помощью хромогенного LAL-теста определяли уровень эндотоксина (HBT, США). С целью оценки тяжести поражения печени в сыворотке крови определяли активность индикаторных ферментов АсАТ и АлАТ (KF 2.6.1.1, «Diagnostic Systems» GmbH, Германия). Для индукции синтеза и секреции цитокинов суспензию клеток селезенки в концентрации 106/мл культивировали 20 ч в 1 мл полной ростовой среды с добавлением конканавалина А (5мкг/мл) в 24-луночных культуральных планшетах при 37°C и 5% CO₂. В культуральной жидкости клеток селезенки тест-системами «eBioscience» (Австрия) определяли концентрацию интерлейкинов (ИЛ) -2, -4, фактора некроза опухоли- α (ФНО- α), интерферона- γ (ИФН- γ). На гистологических препаратах легких проводили подсчет количества нейтрофилов в межальвеолярных перегородках на стандартной площади 25 тыс. мкм². Выраженность патологических изменений в печени оценивали слепым методом полуколичественно в баллах. Нормальность распределения полученных данных и статистическую значимость различий определяли в программах Statistica 7.0 и SigmaStat. Использовали t-критерий Стьюдента, непараметрический критерий Манна-Уитни и факториальный анализ ANOVA. Различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

На 1-е сут развития ССВО по сравнению с самками у самцов ниже концентрация эстрадиола и эндотоксина в сыворотке крови, выше число нейтрофилов в межальвеолярных перегородках легких. В культуральной жидкости клеток селезенки самцов в эти сроки наблюдается увеличение продукции ИЛ-2 и ФНО- α по сравнению с контрольной группой, что отражает поляризацию иммунного ответа преимущественно по Th1-типу. На 1-е сут после введения ЛПС у самок выявлено снижение секреции Кона активированными клетками селезенки ИЛ-2, ФНО- α и ИФН- γ , что отражает супрессию Th1-типа иммунного ответа.

Особенности морфофункциональных и иммунологических проявлений ССВО у новорожденных самцов и самок необходимо учитывать при разработке подходов к прогнозированию тяжести течения и терапии инфекционно-воспалительных заболеваний, в том числе неонатального сепсиса у детей.

ВЛИЯНИЕ ГЛУТАМИЛ-ТРИПТОФАНА НА КЛЕТочный МЕТАБОЛИЗМ И СЕКРЕЦИЮ ЦИТОКИНОВ КЛЕТКАМИ ЭНДОТЕЛИАЛЬНОГО, ЭПИТЕЛИАЛЬНОГО И МОНОЦИТАРНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ

Кудрявцева Т.А., Лебедева А.М.¹, Старикова Э.А.¹

МБНПК «Цитомед» Санкт-Петербург, Россия
¹ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины», Санкт-Петербург, Россия

Введение. Несмотря на значительный прогресс, достигнутый в медицине в последние десятилетия, проблема лечения длительно незаживающих ран полностью не решена. Причиной развития незаживающих ран считают развитие хронического воспаления, сопровождающегося усиленной секрецией провоспалительных цитокинов, матриксных металлопротеиназ, а также снижением продукции ростовых факторов. Дисрегуляция энергетического метаболизма клеток, вследствие нарушения трофики, приводит в свою очередь к развитию оксидативного стресса и дальнейшей амплификации воспаления. Поведенные ранее исследования показали, что короткие пептиды, обладающие иммуномодулирующими свойствами, в частности глутамил-триптофан в виде мононатриевой соли (ГТ) обладают ранозаживляющими свойствами.

Цели и задачи. Целью работы было изучение влияния ГТ на энергетический метаболизм и секрецию провоспалительных цитокинов клетками эндотелиального, эпителиального и моноцитарного происхождения *in vitro*.

Материалы и методы. В процессе работы проводились экспериментальные исследования влияния ГТ и препарата сравнения актовегина на спонтанную и индуцированную продукцию провоспалительных цитокинов IL-6, IL-8 эндотелиальными (линия EA.hy 926), эпителиальными клетками (линия A431) и клетками гемопоэтического происхождения (ТНР-1). Влияние изучаемых препаратов на интенсивность внутриклеточного метаболизма оценивали по активности митохондриальных дегидрогеназ с помощью МТТ-теста. Для моделирования нарушения процессов трофики *in vitro* клетки культивировали в присутствии испытуемых препаратов в среде с пониженным содержанием сыворотки. Статистическая обработка результатов проводилась с использованием программы «STATISTICA 6.0».

Результаты. Оба препарата не оказывали токсического влияния на представленные клеточные линии в концентрациях ниже 1,0 мг/мл. Актовегин достоверно повышал интенсивность метаболизма эпителиальных и эндотелиальных культур клеток в концентрации от 10,0 нг/мл до 0,1 мг/мл, а клеток ТНР-1 в концентрации 1,0 мг/мл и 0,1 мг/мл. Известно, что актовегин активизирует клеточный метаболизм путем увеличения транспорта и накопления глюкозы и кислорода, усиливая их внутриклеточную утилизацию. В аналогичных условиях ГТ оказывал стимулирующее влияние на клеточный метаболизм EA.hy 926 и A431 в более широком диапазоне от 0,1 нг/мл до 0,1 мг/мл, а клеток ТНР-1 в концентрации 10,0 мкг/мл и 1,0 мкг/мл. Влияние актовегина на секрецию цитокинов IL-8 и IL-6 культурами клеток было разнонаправленным. Препарат подавлял секрецию IL-8 клетками EA.hy 926 и A431, но усиливал индуцированную под влиянием TNF α секрецию этого цитокина клетками ТНР-1. Актовегин усиливал секрецию IL-6 клетками ТНР-1. На секрецию клетками A431 IL-6 актовегин действовал разно-

направленно (усиливал в концентрациях 1,0 мг/мл и 1,0 мкг/мл, в концентрации 1,0 нг/мл — снижал). Секреция IL-6 клетками EA.hy 926 после инкубации с актовегином достоверно не изменялась. Дипептид ГТ в разных концентрациях понижал собственную и индуцированную секрецию обоих цитокинов клетками EA.hy 926 и A431. При этом на спонтанную секрецию цитокинов моноцитоподобными клетками препарат оказывал разнонаправленное влияние, но во всех концентрациях усиливал индуцированную TNF α продукцию IL-6. IL-6 — цитокин, обладающий плеiotропными эффектами, секретруется клетками на ранней стадии развития воспаления. IL-6 индуцирует секрецию белков острой фазы, продукцию антител В-лимфоцитами. В комбинации с TGF β он направляет дифференцировку Т-лимфоцитов в сторону Th17 и подавляет дифференцировку Treg лимфоцитов. В то же время, IL-6 способствует дифференцировке остеокластов, пролиферации кератиноцитов и стимулирует процессы ангиогенеза. IL-8 — провоспалительный хемокин, являющийся хемоаттрактантом преимущественно для гранулоцитов, и, в меньшей степени, для моноцитов, привлекает лейкоциты в очаг воспаления и, тем самым, способствует амплификации воспаления. Кроме того, IL-8 обладает проангиогенными свойствами и может способствовать ранозаживлению. То есть, данные цитокины могут как положительно, так и отрицательно влиять на регенерацию.

Заключение. Можно предположить, что наблюдаемый эффект исследуемых препаратов по-видимому связан с их положительным влиянием на метаболизм клеток тканей, а так же с модулированием секреции провоспалительных факторов.

ХОЛИНЕРГИЧЕСКАЯ РЕГУЛЯЦИЯ FcR-ЛИГАНД-ЗАВИСИМОЙ ДЕГРАДУЛЯЦИИ ТУЧНЫХ КЛЕТОК

Кутукова Н.А., Трулев А.С., Кудрявцев И.В., Гусельникова В.В., Назаров П.Г.

Институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, Россия

Введение. Тучные клетки млекопитающих — это мультипотентные клетки, являющиеся резидентными составляющими соединительной ткани. Их расположение всегда сконцентрировано на границе с внешней средой, в тесной ассоциации с кровеносными и лимфатическим сосудами, а также с нервными терминалями. Близкое соседство нервных окончаний вегетативной нервной системы дает основание рассматривать тучные клетки в контексте нейро-иммунных взаимодействий. На сегодняшний день наиболее хорошо изучено взаимодействие тучных клеток с пептидергическими нервными волокнами, мутуалистические связи между которыми были показаны на микроанатомическом и молекулярном уровнях. Помимо пептидергических, холинергические нервные волокна также обладают иммуномодулирующими свойствами, в том числе в отношении тучных клеток. Однако о влиянии блуждающего нерва на функциональную активность тучных клеток известно мало. Установлено, что холинергическая регуляция тучных клеток зависит от видовой и тканевой принадлежности последних. Так, ацетилхолин (АХ) обладает ингибирующим влиянием в отношении антиген-зависимой дегрануляции тучных клеток человека, и эта ингибция, вероятно, опосредована мускариновыми холинорецепторами (м-АХР). В случае

тучных клеток грызунов сдерживающее влияние ацетилхолина на антиген-индуцированную дегрануляцию реализуется посредством никотиновой регуляции. Вопрос о характере взаимоотношений между холинергическими нервными волокнами и тучными клетками весьма неоднозначен и, несмотря на длительность изучения, по-прежнему актуален и требует детального рассмотрения.

Целью работы являлось изучение влияния холинергической активации на функциональную активность тучных клеток на примере человеческой линии клеток НМС-1 и перитонеальных тучных клеток мыши (ПТК).

Материалы и методы. В качестве источника ПТК использовали мышей линии СВА (18–20 г). Моделью тучных клеток человека служили клетки перевиваемой линии НМС-1, которые по многим аспектам сопоставимы с незрелыми тучными клетками соединительной ткани. Дегрануляцию клеток индуцировали лигандами Fc-рецепторов (FcR): дегрануляцию ПТК — антителами против IgE мыши, дегрануляцию клеток НМС-1 — агрегированным IgG человека. В качестве агониста АХР использовали карбахол (КХ) (0,01 мМ), функциональный аналог АХ. Для блокады н-АХР использовали бензогексоний (БГ) (0,01 мМ), для блокады М1-АХР — пирензепин (1 мМ). Клетки НМС-1 (2×10^6 кл/500 мкл) и ПТК (2×10^6 кл/500 мкл) предварительно обрабатывали агонистом (или антагонистом) АХР, а далее стимулировали дегрануляцию лигандами FcR (30 мин, 37 °С). Холинергические агенты также добавляли к клеткам и без одновременной активации лигандами FcR. Дегрануляцию оценивали по степени высвобождения маркерных медиаторов тучных клеток: гистамина и β -гексозаминидазы.

Результаты. КХ вел себя как активатор тучных клеток: стимулировал дегрануляцию как клеток НМС-1, так и ПТК. Выявлена зависимость КХ-индуцированной дегрануляции клеток НМС-1 от никотиновой регуляции. Степень высвобождения гистамина и β -гексозаминидазы достоверно снижалась после предварительной инкубации клеток НМС-1 с БГ, блокатором н-АХР. Влияния пирензепина, блокатора М1-холинорецепторов, на дегрануляцию тучных клеток линии НМС-1, вызванную КХ, обнаружено не было. В случае ПТК ни БГ, ни пирензепин не оказывали достоверного подавляющего влияния на КХ-стимулированную дегрануляцию, хотя влияние пирензепина имело тенденцию к ингибции данного ответа.

То., рассмотрение двух способов активации тучных клеток — через Fc ϵ R (активация ПТК антителами к IgE) и через Fc γ R (активация клеток НМС-1 агрегированным IgG) показало следующее. КХ, аналог АХ, оказывал подавляющее действие на анти-IgE-стимулированное высвобождение гистамина и β -гексозаминидазы из ПТК. При этом применение БГ не отменяло ингибирующего влияния холинергического агониста, в отличие от пирензепина, который частично антагонизировал влиянию КХ. При исследовании влияния холинергической стимуляции на IgG-опосредованную активацию тучных клеток мы показали, что КХ достоверно усиливал действие агрегированного IgG на клетки НМС-1. Опираясь на литературные данные, мы выбрали пирензепин для исследования вопроса об участии М1-мускариновых рецепторов в модуляции IgG-зависимой дегрануляции при помощи КХ. Однако достоверного влияния пирензепина на дегрануляцию клеток НМС-1 обнаружено не было как при действии на клетки одного КХ, так и при действии КХ совместно с агрегированным IgG. С другой стороны, БГ

достоверно снижал стимулирующее влияние КХ на IgG-опосредованный ответ клеток НМС-1, а также дегрануляцию, вызываемую одним КХ.

Заключение. Резюмируя полученные данные, следует отметить, что тучные клетки человеческой линии НМС-1 и перитонеальные тучные клетки мыши отвечали выбросом гистамина и β -гексозаминидазы на действие как одного холинергического агониста, так и КХ в сочетании с FcR-лигандами. Холинергическое влияние не изменяло функциональную активность тучных клеток существенно, но модулировало их ответ на FcR-лиганды. В случае клеток НМС-1 холинергическая стимуляция регулировала Fc γ R-зависимую дегрануляцию через н-АХР, а в случае ПТК – Fc ϵ R-зависимую дегрануляцию через м-АХР. Таким образом, мы показали, что АХ способен корректировать антиген-индуцированный ответ тучных клеток (т.е. ответ, вызываемый антиген-содержащими иммунными комплексами через FcR) и тем самым влиять на характер протекания воспалительной реакции.

СЕРТОНИН КАК РЕГУЛЯТОР РАЗВИТИЯ ТИМУСА

Лифанцева Н.В., Мельникова В.И.

ФГБУН Институт биологии развития
им. Н.К. Кольцова РАН, Москва, Россия

Введение. Серотонин является одним из регуляторов развития различных тканей плода. Известно его участие в процессах гаструляции и нейруляции, морфогенетическое влияние на формирование лицевого черепа, сердца и некоторых отделов мозга у млекопитающих. У половозрелых животных хорошо изучено регуляторное влияние серотонина на иммунную систему. Известно, что серотонин контролирует процессы дифференцировки Т-лимфоцитов, активность Т-клеток-помощников, естественных клеток-киллеров. Свои иммунотропные эффекты серотонин осуществляет через специфические рецепторы на клетках иммунной системы. В то же время о его роли в развитии иммунной системы известно крайне мало. Ранее нами было показано, что фармакологическое снижение уровня серотонина в крови плодов в период активного формирования тимуса приводит к необратимым изменениям в Т-системе иммунитета в постнатальном развитии. Тем не менее, остается открытым вопрос о возможности прямого действия серотонина на развивающийся тимус, поскольку нет данных об экспрессии его рецепторов в тимусе плодов. Также не исследована возможность синтеза серотонина клетками эмбрионального тимуса, в то время как Т-лимфоциты половозрелых крыс способны его синтезировать.

Цель и задачи. В настоящей работе исследовали возрастную динамику экспрессии рецепторов к серотонину, возможность синтеза и захвата серотонина в эмбриональном тимусе, а также отдаленные последствия блокады рецепторов к серотонину 1 типа на формирование тимуса в пренатальном периоде развития.

Материалы и методы. Возрастную динамику экспрессии рецепторов к серотонину в тимусе оценивали методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с обратной транскрипцией у плодов, начиная с 15-го дня эмбрионального развития (Э15). Возможность синтеза серотонина в тимусе плодов оценивали по экспрессии триптофангидроксилазы методами ПЦР и Вестерн-блоттинга. Захват серотонина исследовали с помощью иммуногистохимического выявления серотонина в эмбриональном тимусе после

инкубации его в присутствии серотонина (10^{-7} М) и ингибитора транспортера серотонина - флюоксетина (10^{-5} М). Для оценки отдаленных последствий блокады рецепторов к серотонину 1 типа вводили однократно плодам *in utero* на Э17 антагонист NAN-190. У родившегося потомства на 20-й и 40-й дни постнатального развития (П20 и П40) оценивали функциональную активность Т-лимфоцитов тимуса по пролиферативному ответу, индуцированному КонА. Влияние антагониста NAN-190 на созревание субпопуляций тимоцитов исследовали в органотипической культуре тимусов, выделенных из плодов на Э18, с помощью проточной цитометрии и окрашивания антителами к антигенам CD4 и CD8 («Cederlain»).

Результаты. В тимусе плодов обнаружена мРНК рецепторов к серотонину 1a-, 1b-, 2a- и 2b- типов начиная с Э15-Э16. Однократное введение плодам *in utero* на Э17 антагониста серотониновых рецепторов 1- типа (NAN-190) приводит к необратимому усилению пролиферативного ответа тимоцитов на митоген в постнатальном периоде развития. Добавление антагониста NAN-190 в органотипическую культуру тимусов стимулирует дифференцировку ранних предшественников CD4-CD8--фенотипа в тимоциты CD4+CD8+-фенотипа. Экспрессия триптофангидроксилазы - скорость-лимитирующего фермента синтеза серотонина - выявлена в тимусе плодов начиная с Э16. Установлено существование захвата серотонина клетками тимуса плодов на Э18 и его ингибирования флюоксетином.

Заключение. Совокупность полученных данных позволяет нам сделать вывод о морфогенетической роли серотонина в критический период развития тимуса у крыс. Экспрессия рецепторов к серотонину в тимусе плодов свидетельствует о возможности прямого действия серотонина на формирующийся тимус. Наличие собственного синтеза серотонина наряду с его захватом в тимусе плодов говорит о возможности реализации эффектов серотонина как через аутокринно-паракринные, так и через эндокринные механизмы.

ВЛИЯНИЕ АКТИВАЦИИ ГАМКЕРГИЧЕСКОЙ СИСТЕМЫ МОЗГА НА КЛЕТОЧНОЕ ЗВЕНО ВРОЖДЕННОГО ИММУНИТЕТА ЛЕГКИХ ПРИ ДИСФУНКЦИИ ДОРЗАЛЬНОГО ГИППОКАМПА

Лукина С.А., Волкова Е.В., Тимофеева М.Р., Яковенко О.В.

ГБОУ ВПО «Ижевская государственная медицинская академия», Ижевск, Россия

Установлено, что нейрхимический дисбаланс и органические повреждения нервной системы часто сопряжены с изменениями механизмов врожденного и адаптивного иммунитета. Одной из структур центрального аппарата нейроиммунорегуляции и нейроиммуномодуляции является гиппокамп, имеющий сложную нейрхимическую организацию. Известно о роли дофаминергической, серотонинергической систем мозга в гиппокампальных влияниях на иммунный ответ организма (Геворкян М.М. с соавт., 2010, Segerstrom S.C., 2008). Целью исследования стало изучение механизмов неспецифической резистентности легких в условиях активации дорзального гиппокампа и повышения активности ГАМКергической медиаторной системы мозга. Эксперименты выполнены на 85 крысах-самцах, с соблюдением правил работы с лабораторными животными (89/609/ЕС). Животные были

разделены на 5 групп: 1 - введение ГАМК (20 мкМ в 1 мкл) в боковой желудочек мозга через день в течение 14 дней, 2-ложнооперированные животные с интравентрикулярным введением 1 мкл 0,9% раствора натрия хлорида; 3-активация дорзального гиппокампа путем стереотаксического введения 1 мг порошкообразного кобальта; 4- активация гиппокампа в сочетании с интравентрикулярным введением ГАМК с 7 по 14 день эксперимента, в условиях сформированного очага патологической активности; 5 – ложнооперированные животные с погружением микроинъектора в область дорзального гиппокампа. Спустя 14 дней определяли клеточный состав бронхо-альвеолярных смывов (БАС), фагоцитарную активность макрофагов по поглощению частиц монодисперсного латекса, рассчитывали фагоцитарный индекс и фагоцитарное число. Было установлено, что при формировании патологической детерминанты в области дорзального гиппокампа уменьшалось число активированных макрофагов в составе БАС и понижалась их фагоцитарная активность ($p < 0,01$). Интравентрикулярное введение ГАМК животным с дисфункцией гиппокампа сопровождалось восстановлением активности механизмов врожденного иммунитета. В составе БАС число фагоцитирующих макрофагов не только достигло контрольных значений, но и значительно увеличилось: фагоцитарный индекс составил $74,29 \pm 1,91$, при $25,25 \pm 0,75$ – в условиях активации гиппокампа ($p < 0,01$), и $48,55 \pm 1,01\%$ – в контроле ($p < 0,05$); фагоцитарное число увеличилось в 2,18 раз ($p < 0,01$), преобладающей фракцией в БАС стали лимфоциты ($52,5 \pm 1,88$, при $13,89 \pm 0,97$ - в контроле и $23,75 \pm 1,22\%$ - при воздействии на гиппокамп). Аналогичная динамика исследуемых параметров отмечалась при введении ГАМК в боковой желудочек мозга. В составе БАС также значительно увеличилось содержание лимфоцитов и составило $62,67 \pm 4,51\%$, фагоцитарное число достигло $4,03 \pm 0,06$ у.е. ($p < 0,01$).

Таким образом, активация ГАМКергической системы мозга устраняет явления иммуносупрессии, индуцированные активацией гиппокампа, и оказывает модулирующее влияние на механизмы врожденного иммунитета.

ПРОТЕАСОМЫ И МОЛЕКУЛЫ ГЛАВНОГО КОМПЛЕКСА ГИСТОСОВМЕТИМОСТИ В РАЗВИТИИ ГОЛОВНОГО МОЗГА У МЛЕКОПИТАЮЩИХ

Люпина Ю.В., Орлова А.Ш., Карпова Я.Д., Астахова Т.М., Шарова Н.П.

ФГБУН Институт биологии развития
им. Н.К. Кольцова РАН, Москва

Введение. Молекулы ГКГ класса I играют важную роль в синаптической пластичности нервной системы и реализации адаптивного иммунного ответа у млекопитающих. Протеолитические комплексы, протеасомы, образуют олигопептиды, презентуемые на поверхности клеток в составе молекул ГКГ класса I, а также регулируют многочисленные клеточные процессы в органах центральной нервной и иммунной систем зрелого и развивающегося организма.

Цель и задачи. Целью настоящей работы было выявление роли протеасом и молекул ГКГ класса I в развитии головного мозга млекопитающих. Задачи: изучение динамики экспрессии иммунных протеасом, активаторов протеасом в сравнении с динамикой химоатрипсинподобной активности (ХПА) и каспазаподобной активностью

(КПА) протеасом и изменениями экспрессии ГКГ класса I в лимфоидных органах (печени, селезенке) и отделах мозга крыс в эмбриональном (Э17, Э19, Э21) и раннем постнатальном (П0, П1, П3, П7, П10, П15, П25) развитии, а также исследование особенностей функционирования протеасом и связанных с ними сигнальных путей в различных отделах головного мозга у B2m-мышей, нокаутных по $\beta 2$ -микроглобулину, составной части молекул ГКГ I.

Материалы и методы. ХПА и КПА в осветленных гомогенатах структур головного мозга, селезенки и печени животных определяли по гидролизу флуорогенных олигопептидов Suc-LLVY-AMC и Z-Leu-Leu-Glu-AMC, соответственно. Содержание LMP7 и LMP2 иммунных субъединиц, активаторов PA700 и PA28 протеасом, NeuN (нейронального ядерного белка), gFAP (глиального фибриллярного кислого белка), pNOS (нейрональной NO-синтазы), белка теплового шока HSP70 и ГКГ класса I оценивали помощью Вестерн-блоттинга. Методом двойного и тройного иммунофлуоресцентного мечения оценивали коэкспрессию иммунных субъединиц протеасом в нейральных и лимфоидных клетках.

Основные результаты. Обнаружено, что структуры с разным соотношением экспрессии NeuN и gFAP - фронтальная кора, мозжечок и ствол мозга, характеризуются разнонаправленными изменениями в пулах протеасом в процессе их онтогенеза. В мозжечке и стволе мозга было отмечено повышение экспрессии иммунных субъединиц LMP7 и LMP2, а также ХПА и КПА в эмбриональный период Э17 - Э21 и ранний постнатальный П15 - П25. Однако в коре головного мозга в период Э17 - Э19 наблюдалось снижение уровня LMP7 и LMP2 и повышение КПА. Содержание активаторов протеасом PA700 и PA28 снижалось в коре, но не в мозжечке и стволе мозга в период П3 - П5. В селезенке наблюдалось постепенное увеличение количества LMP7 и LMP2 в период П10 - П25, в то время как в печени период постепенного повышения уровня иммунных субъединиц протеасом на Э17 - Э19 сменялся периодом падения на П5. Этот уровень достоверно не изменялся до П18 и повышался на П25. В период П15 - П25 в селезенке повышался уровень активатора PA700, а в печени в период П1 - П8. Молекулы ГКГ класса I в селезенке и печени крыс выявлялись только в периоды повышения уровня экспрессии иммунных субъединиц протеасом. Повышение ХПА и КПА протеасом связано с периодом формирования гематоэнцефалического барьера, функционального созревания коры и мозжечка головного мозга и лимфоидных органов у крыс. У B2m-нокаутных мышей в большинстве отделов головного мозга обнаружен дефицит NeuN и gFAP по сравнению с контрольными животными. В коре B2m-нокаутных мышей повышены ХПА, экспрессия иммунной субъединицы LMP7 и регулятора PA28 протеасом, в то время как в стволе эти показатели снижены. Содержание сигнальных молекул pNOS и HSP70 в коре B2m-нокаутных мышей также было повышено, а в стволе – снижено, что может быть связано с контролированием ими экспрессии субъединицы LMP7 и регулятора PA28. Мозжечок характеризуется отличной от всех структур картиной функционирования протеасом. В нем повышена экспрессия иммунных субъединиц LMP7 и LMP2 и регулятора PA28, но понижена экспрессия регулятора PA700. Выявленные нарушения в структурах головного мозга B2m-нокаутных мышей в отсутствие молекул ГКГ I компенсируются по-

вышенной экспрессией иммунных субъединиц и регулятора RA28 протеасом в коре и мозжечке.

Заключение. Изменение экспрессии иммунных LMP7 субъединиц, активатора RA700 протеасом и молекул ГКГ класса I в лимфоидных органах иммунной системы сопряжены с важными этапами формирования иммунологической толерантности головного мозга. Иммунные протеасомы регулируют ключевые биохимические процессы развития и иммунной и центральной нервной систем у млекопитающих, обеспечивая возникновение синаптических связей и синаптическую пластичность и управляя иммунными реакциями организма.

Работа выполнена частично при финансовой поддержке гранта РФФИ 15-04-03494.

ИЗУЧЕНИЕ ПРОЦЕССОВ АКТИВАЦИИ ЦИТОКИНОВ ГРУППЫ IL-36

Маликова А.З., Сура Труэба С., Давидович П.Б., Зиновьева А. Е., Мартин Ш., Гарабаджиу А.В.

Санкт-Петербургский государственный технологический институт (технический университет), Санкт-Петербург, Россия

Интерлейкины группы IL-36 способны в различных типах клеток инициировать синтез других цитокинов и, таким образом, действовать в качестве возбудителей и амплификаторов иммунного ответа и воспалительных процессов. В настоящее время известно, что белки IL-36 играют ключевую роль в процессах воспаления кожной ткани, в частности, при псориазе. Несмотря на доказанную роль интерлейкинов группы IL-36 в патогенезе псориаза, в настоящее время отсутствуют методы иммунодиагностики этих белков, а также способы их инактивации у больных псориазом. Получение моноклональных антител позволяет своевременно обнаружить и «выключить» эти цитокины из воспалительного процесса.

Целью данной работы было получение активных белков-цитокинов IL-36 α , IL-36 β , IL-36 γ из бактериальных клеток экспрессионного штамма E.coli методом аффинной хроматографии. Известно, что IL-36 синтезируются в виде белков, требующих процессирования для активации. Поэтому были выделены и очищены полноразмерные белки IL-36 α , IL-36 β , IL-36 γ и белки IL-36 с вшитым мотивом DEVD, который распознается каспазой-3 и позволяет их активировать.

Активность белков была оценена на клеточной линии HeLa, любезно предоставленной проф. Ш. Мартина (Дублин, Ирландия). В качестве модельного объекта была использована стабильная клеточная линия HeLa с гиперэкспрессией рецептора IL-36R (HeLa^{IL-36R}), с помощью которой оценивали степень активации IL-36 по уровню секретируемых IL-6 и IL-8. При обработке этих клеток процессированными формами интерлейкинов IL-36 происходит связывание с рецептором IL-36R, что приводит к активации синтеза ряда цитокинов и хемокинов (например, IL-6 и IL-8), которые секретируются в среду и могут быть детектированы с помощью ИФА. Результаты определения уровня IL-6 и IL-8 в клеточном супернатанте после инкубирования клеток HeLa в присутствии полноразмерных и процессированных форм IL-36 показали, что активность непроецессированного белка значительно меньше, чем процессированного. Так при концентрации белка в клеточном супернатанте 62,5 пМ уровень IL-8 в пробах с процессированным белком в 1500 раз превы-

шает аналогичный в пробах с непроецессированным IL-36, уровень IL-6 в свою же очередь – в 5000 раз.

Таким образом, полученные белки могут выступать в качестве положительных стандартов для анализа активности белков группы IL-36. Более того, на основе выделенных белков IL-36 становится возможным создание антител, распознающих группу этих белков, что позволит их использовать для нейтрализации воспалительных реакций, а также применять в ИФА.

Работа поддержана грантом Правительства Российской Федерации № 14.В25.31.0013.

ЭФФЕКТ ТРАНСПЛАНТАЦИИ МОДУЛИРОВАННЫХ НЕЙРОЛЕПТИКОМ ИММУНОКОМПЕТЕНТНЫХ КЛЕТОК У ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ ЖИВОТНЫХ В СОСТОЯНИИ АГРЕССИИ

Маркова Е.В., Княжева М.А.

НИИ фундаментальной и клинической иммунологии, Новосибирск, Россия

Введение. Нарушение нейроиммунных взаимодействий является первичным, либо вторичным фактором в патогенезе многих заболеваний, включая поведенческие расстройства, оказывая негативное влияние на ход заболевания, утяжеляя клиническую картину, снижая эффективность терапии. Нейролептики достаточно эффективны и широко применяются при соответствующих психотических состояниях. Однако, они обладают рядом негативных побочных эффектов, что в ряде случаев ограничивает возможности их длительного использования, одним из которых является возникновение привыкания к ним, а, в ряде случаев, и зависимости. Терапия поведенческих расстройств, применяемая в настоящее время, не обеспечивает полного излечения, очевидно, в связи с формированием «порочного круга», разорвать который возможно лишь путем нормализации регуляторной взаимосвязи ЦНС и иммунной системы. Одним из способов решения этой проблемы является разработка новых методов терапии на основе иммунологических подходов. Как показали наши предыдущие исследования, функциональная активность иммунной системы и, в частности, ее клеточных элементов, связана с уровнем ориентировочно – исследовательского поведения и параметры последнего могут быть направленно изменены трансплантацией иммунокомпетентных клеток с определенными функциональными характеристиками. Целью настоящего исследования явилось изучение возможности получения нейролептического эффекта у экспериментальных животных в состоянии агрессии путем трансплантации иммунокомпетентных клеток, функциональная активность которых была изменена предварительной обработкой препаратом фенотиазинового ряда - аминазином.

Методы исследования: в экспериментах в качестве доноров и реципиентов использовались мыши-самцы (СВАхС57Bl/6)F1 в возрасте трех месяцев, у которых агрессивный тип поведения был сформирован под влиянием длительного социального стресса (метод парного дистантного сенсорного контакта). Иммунокомпетентные клетки для трансплантации получали из суспензии спленоцитов доноров, культивировали их *in vitro* с аминазином и затем внутривенно вводили сингенным реципиентам. В контрольной группе животных подготовка и трансплантация клеток проводилась в аналогичных условиях эксперимента, за исключением того, что послед-

ние культивировались без присутствия нейролептика. У мышей — реципиентов регистрировались параметры функциональной активности нервной и иммунной систем.

Результаты исследования: Культивирование донорских иммунокомпетентных клеток с амиразином изменяет их функциональную активность, проявляющуюся в снижении спонтанной, повышении ЛПС - стимулированной пролиферативной активности и модуляции продукции ряда регуляторных цитокинов. У животных в состоянии агрессии, после трансплантации сингенных спленоцитов, экстракорпорально обработанных амиразином, наблюдались изменения поведения в тесте «открытое поле», проявляющиеся в снижении двигательной и исследовательской активностей, сопровождающиеся снижением уровня эмоциональной реактивности. У реципиентов регистрировалось также изменение соотношения длительности периодов мобильности и иммобилизации в сторону увеличения последнего в тесте принудительного плавания по Порсолту. Указанные изменения в поведении мышей-реципиентов регистрировались на фоне модуляции продукции ряда провоспалительных цитокинов (ИЛ- β , ИЛ-6, ФНО α) в головном мозге. Со стороны иммунной системы у животных - реципиентов после клеточной трансплантации было выявлено снижение спонтанной и ЛПС - стимулированной пролиферативной активности спленоцитов и повышение интенсивности развиваемой реакции гиперчувствительности замедленного типа.

Заключение. В настоящем исследовании показана возможность получения нейролептического эффекта у экспериментальных животных, находящихся в состоянии агрессии, путем трансплантации иммунокомпетентных клеток, экстракорпорально обработанных амиразином. Полученный эффект опосредуется изменением характера нейроиммунных взаимодействий, вследствие модуляции функциональной активности нервной и иммунной систем. Дисрегуляция нейроиммунных связей является существенным фактором патогенеза агрессии. Одним из ведущих звеньев патогенетического механизма указанной патологии являются нарушение центральной и периферической продукции цитокинов, эффекты которых опосредуются клеточными элементами иммунной системы. Методом выбора при данной патологии может стать иммунотерапия аутологичными иммунокомпетентными клетками, функциональная активность которых экстракорпорально изменена психоактивными препаратами. Данный подход, исключает нежелательные побочные эффекты, возникающие при непосредственном приеме соответствующих препаратов, что расширяет возможности использования последних; равно как и возможности применения клеточных технологий.

УЧАСТИЕ ФАКТОРА СТВОЛОВОЙ КЛЕТКИ В РЕПАРАТИВНОЙ РЕГЕНЕРАЦИИ ПЕЧЕНИ ПРИ ЕЕ ТОКСИЧЕСКОМ ПОВРЕЖДЕНИИ

Медведева С.Ю., Мухлынина Е.А., Булавинцева Т.С., Данилова И.Г.

Институт иммунологии и физиологии УрО РАН, Институт медицинских клеточных технологий, Уральский федеральный университет, Екатеринбург, Россия

Исследование механизмов репаративной регенерации печени в настоящее время продолжает оставаться

актуальной задачей физиологии и медицины. Восстановительный рост печени при действии классического гепатотропного яда тетрахлорметана (CCl₄) возможен из различных источников, в том числе и при участии гемопозитических стволовых клеток (ГСК). При этом особый интерес представляет изучение молекулярных механизмов мобилизации ГСК из костного мозга в поврежденную печень. Ключевым цитокином в данном процессе является фактор стволовой клетки (SCF). Установлено, что печень в норме содержит значительное количество как мембрансвязанного, так и растворимого SCF. Наряду с гепатоцитами к синтезу SCF в печени способны эндотелиоциты и клетки Купфера.

Целью настоящего исследования явилось изучение роли SCF в репаративной регенерации печени при ее диффузном токсическом повреждении.

Материалы и методы. Моделирование токсического гепатита проводили введением крысам-самцам линии Wistar CCL4 в дозе 50 мг/кг. Условия обращения с животными соответствовали Директиве ЕС 2010/63/EU. На 3 и 7 сутки эксперимента на срезах поджелудочной железы иммуногистохимически определяли количество Ki67 пролиферирующих гепатоцитов (Purified Mouse Anti-Human Ki-67, BD Biosciences, USA). Имуноферментным методом определяли содержание SCF в крови экспериментальных животных (SCF Mouse ELISA kit, Abcam, UK).

Основные результаты. Проведенные исследования свидетельствуют, что на фоне высокого индекса альтерации на 3 сутки после введения CCl4 количество Ki67 позитивных клеток возрастает по сравнению с интактными животными в 3,3 раза. К 7 суткам эксперимента эти показатели снижаются до соответствующих значений, отмеченных у здоровых крыс. Уровень сывороточного SCF у интактных крыс составил $1235,33 \pm 81,81$ pg/mL. В ответ на повреждение печени уже на 3 сутки после воздействия наблюдается увеличение содержания данного ростового фактора в крови в 1,62 раза. На 7 сутки после введения CCl4 повышенный уровень фактора стволовой клетки в крови сохраняется и составляет $1717,60 \pm 37,99$ pg/mL (в 1,39 раза выше уровня у интактных животных).

Заключение. Таким образом, диффузное повреждение печени сопровождается выбросом фактора стволовой клетки в кровь предположительно в результате повышенного синтеза данного ростового фактора гепатоцитами и печеночными макрофагами. Поскольку миграция гемопозитических стволовых клеток возможна по градиенту концентрации SCF, полученные результаты косвенно свидетельствуют об участии ГСК в восстановительном росте печени при ее токсическом повреждении.

ПРОТИВОСПАЛИТЕЛЬНАЯ АКТИВНОСТЬ БЕЛКОВ γ -ГЛОБУЛИНОВОЙ ФРАКЦИИ: ИНГИБИРОВАНИЕ ВЫРАБОТКИ КЛЕТКАМИ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА ХЕМОКИНА MCP-1

Мездрохина А.С., Апрецова М.А., Бабаянц А.А., Чекнёв С.Б.

ФГБУ «Федеральный научно-исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России, Москва, Россия

Одним из ранних проявлений воспалительного процесса служит выработка клетками крови человека хемокина MCP-1. Она индуцируется одновременно с продук-

цией IL-8 и фактора роста GM-CSF и усиливается под действием IL-1 β , IFN- γ и TNF- α . Белки γ -глобулиновой фракции, хелатирующие из периглобулярного пространства катионы металлов и претерпевающие вследствие этого конформационные преобразования в области их Fc региона, меняют динамику взаимодействия с Fc рецепторами клеток и ингибируют продукцию раннего IL-1 β и IL-6, раннего IL-2 и IFN- γ , IL-8, а также комплекса факторов роста GM-CSF, G-CSF и VEGF, индуцированную контрольными белками и изолированно катионами металлов, реализуя тем самым противовоспалительную активность.

Целью работы явилась оценка выработки клетками периферической крови (КПК) человека хемокина MCP-1, индуцированного металлокомплексами γ -глобулина, образованными с катионами меди и цинка.

Материалы и методы. Индукцию MCP-1 в суспензиях КПК человека (10^6 клеток в 1 мл) проводили в полной питательной среде, в культуральных условиях, в течение 24, 48 и 72 час. Образцы модифицированного катионами меди или цинка человеческого сывороточного γ -глобулина (ICN) и контрольных белков применяли в конечной концентрации 0.5 мкг/мл. Концентрация металлов в катионных контролях составляла: цинка – 2.5 нг/мл, меди – 1.0 нг/мл и соответствовала количеству катионов, связавшихся с белком на препаративном этапе исследования. Контрольными индукторами выработки служили фитогемагглютинин Р (ФГА, Difco, 1.0 мкг/мл) и вирус болезни Ньюкасла (10 ЦПД на клетку). Содержание MCP-1 в супернатантах индуцированных КПК определяли методом ИФА с использованием ELISA Processor II (Behring) и наборов для ИФА ЗАО «Вектор-Бест». Полученные супернатанты тестировали в разведениях исходного образца питательной средой 1/2 и 1/20. Достоверность различия средних величин устанавливали с помощью t-критерия Стьюдента.

Результаты. Белки γ -глобулиновой фракции и катионы меди, примененные изолированно, на сроках 24 и 48 час наблюдения индуцируют выработку КПК человека до 7.2 нг/мл MCP-1, что в 1.1-1.5 раза ($p < 0.001-0.05$) превышает уровень спонтанной продукции. Катионы цинка не индуцируют выработку MCP-1. Образование металлокомплексов γ -глобулина с катионами меди снижает индуцирующий потенциал формирующих комплекс белков и катионов меди. Комплекс с медью индуцирует в 1.1-1.5 раза ($p < 0.001-0.01$) меньше MCP-1, чем его белковый и катионный контроли. При этом белковый комплекс с цинком реализует в 1.2-1.5 раза ($p < 0.001-0.01$) меньшую по сравнению с контрольным γ -глобулином индуцирующую активность.

Заключение. Противовоспалительная активность, реализуемая γ -глобулинами, трансформированными связыванием катионов меди и цинка, проявляется не только на уровне выработки цитокинов Th1 и Th2 ответа или ингибированием продукции КПК человека комплекса ростовых факторов GM-CSF, G-CSF и VEGF, но также торможением индукции хемокина MCP-1, вызываемой контрольными белками и изолированно катионами металлов и играющей существенную роль в запуске воспалительных реакций.

РОЛЬ ГОДАНОДТРОПИН-РИЛИЗИНГ ГОРМОНА В РЕГУЛЯЦИИ РАЗВИТИЯ ТИМУСА

Мельникова В.И., Лифанцева Н.В., Воронова С.Н.

ФГБУН Институт биологии развития
им. Н.К. Кольцова РАН, Москва, Россия

Введение. Формирование нейроэндокринного контроля функций иммунной системы закладывается уже в пренатальном периоде развития и осуществляется на протяжении всей жизни. Однако в раннем онтогенезе, в отличие от позднего постнатального периода, нейроэндокринная система осуществляет не только регуляторные, но и морфогенетические функции. Одной из наиболее важных сигнальных молекул в нейро-эндокрино-иммунном взаимодействии является гонадотропин-рилизинг-гормон (ГРГ), основная роль которого в гипоталамусе связана с регуляцией репродуктивной функции организма. К настоящему времени хорошо изучено регуляторное влияние ГРГ на функционирование иммунной системы у половозрелых животных. В то же время данные об участии ГРГ в раннем развитии иммунной системы немногочисленны. Ранее нами было показано, что ГРГ и его антагонист способны оказывать влияние на функциональную активность тимоцитов уже в пренатальном периоде развития. Известно, что в период онтогенеза, предшествующий формированию гематоэнцефалического барьера, синтезируемый в мозге ГРГ может поступать в общую циркуляцию. Концентрация этого гормона в периферической крови плодов на порядок выше, чем у взрослых животных, что предполагает его участие в регуляции развития периферических органов-мишеней.

Цель и задачи. В настоящей работе исследовали отдаленные последствия воздействия антагониста ГРГ на формирование Т-системы иммунитета. Кроме того, была изучена экспрессия рецепторов к ГРГ в эмбриональном тимусе и влияние ГРГ на синтез цитокинов.

Материалы и методы. Работа выполнена на крысах Вистар с датированной беременностью. Экспрессию рецепторов к ГРГ оценивали методом Вестерн-блоттинга с помощью антител кролика к рецептору ГРГ («Alomone Labs»). Антагонист ГРГ (ID-pGlu,D-Phe_{2,6},Pro₃-LHRH, «Sigma») вводили однократно плодам *in utero* по 20 мкг на 17-й день эмбрионального периода развития (Э17) или крысятам по 50 мкг на 3-й день постнатального развития (ПЗ). У потомства на П20 и П40 оценивали функциональную активность Т-лимфоцитов тимуса по пролиферативному ответу, индуцированному КонА. Синтез цитокинов оценивали методом ПЦР с обратной транскрипцией после культивирования тимусов плодов на Э18 в течение 24 часов в присутствии ГРГ. Статистическую обработку результатов выполняли с помощью непараметрического критерия Вилкоксона.

Результаты. В тимусе плодов, начиная с Э16, были обнаружены рецепторы к ГРГ. Максимальный уровень их экспрессии наблюдали на стадиях Э17–Э18. Однократное введение плодам на Э17 антагониста ГРГ приводило к достоверному снижению пролиферативного ответа тимоцитов на митоген у крысят в дни П20 и П40. В отличие от плодов, однократное введение антагониста ГРГ крысятам на ПЗ не вызывало отдаленных изменений в функциональной активности Т-лимфоцитов. Культивирование тимусов, выделенных из плодов на Э18, в присутствии ГРГ (10⁻⁷ М) привело через 24 часа к повышению содержания мРНК ИЛ-2, ИЛ-4, ИФ-гамма и ФНО-альфа.

Заключение. Совокупность полученных данных позволяет нам сделать вывод о важной морфогенетической роли нейрпептида ГРГ в критический период формирования тимуса. ГРГ, поступающий в кровь плода из мозга и периферических источников (плацента), может через соответствующие рецепторы напрямую воздействовать на клетки-мишени, принимающие участие в морфогенезе тимуса. Наблюдаемые изменения функциональной активности Т-клеток связаны, по-видимому, с тем, что ингибирование рецепторов к ГРГ у плодов приводит к стойким необратимым изменениям в стромальных элементах тимуса, в частности эпителиальных и дендритных клетках. Высокий уровень экспрессии рецепторов к ГРГ в период Э17–Э18, так же как и отсутствие отдаленных последствий при однократном введении антагониста ГРГ постнатальным крысам, свидетельствуют о важном значении ГРГ в регуляции формирования тимуса именно в конце второй декады внутриутробного развития. Влияние ГРГ может реализовываться через изменение баланса цитокинов в эмбриональном тимусе.

НОВАЯ ЗС-ПАРАДИГМА БИМЕДИЦИНСКОГО ИССЛЕДОВАНИЯ: СПОНТАННАЯ МЫШИНАЯ МОДЕЛЬ РЕЦИДИВИРУЮЩЕЙ МИКРОБНОЙ ЭКЗЕМЫ

Моисеева Е.В., Аронов Д.А., Чудаков Д.Б.,
Едакин Р.О., Семушина С.Г.

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва, Россия

Введение. В настоящее время для тестирования эффективности противомикробных препаратов принято использовать молодых СПФ-животных (SPF – specific pathogen free, свободные от специфических патогенов), которые воспроизводят только отдельные симптомы и не способны адекватно отражать патогенез заболевания человека. Вследствие этого всё чаще выявляется отсутствие эффекта при клинических испытаниях тех препаратов, многообещающие терапевтические эффекты которых были продемонстрированы в эксперименте. В такой ситуации требуется применение адекватных не-СПФ мышшиных моделей, которые помимо различной заранее известной генетической предрасположенности к изучаемому заболеванию, находятся в течение всей жизни под влиянием конвенционального микробиологического окружения. Ранее мы показали, что стареющие мыши линии CBRB при содержании в конвенциональных условиях демонстрируют ряд симптомов хронических инфекционно-воспалительных заболеваний кожи и паркинсонизма. Микробиологический анализ продемонстрировал обсемененность кожи непатогенными и условно-патогенными микроорганизмами, не вызывающими заболевания у молодых мышей. Анализируя литературные данные по бактериальному осложнению atopического дерматита человека, мы предположили, что инфекционные заболевания кожи мышей CBRB также могут являться осложнением atopической экземы, где микробный агент служит триггером хронического заболевания кожи и развивающихся впоследствии аутоиммунных проявлений.

Ранее нами была предложена альтернативная ЗС-парадигма (1Сет - или комплекс нескольких линий мышей с различной генетической предрасположенностью к исследуемому фактору/заболеванию вместо одно-

уровневых мышшиных биомоделей); 2Стадии – или последовательные взаимодополняющие этапы проведения исследования, 3Стратификация – как основной принцип вместо рандомизации) биомедицинских исследований в области экспериментальной онкологии. Мы полагаем, что применение принципов ЗС-парадигмы будет целесообразно и для изучения инфекционно-аллергических заболеваний в эксперименте.

Цель исследования: 1) продемонстрировать рецидивирующий характер хронического заболевания кожи мышшей трех линий в зависимости от пола и возраста; 2) выявить наличие аллергической составляющей; 3) оценить ключевые показатели иммунного статуса, характерные для atopической экземы.

Материалы и методы. За последние три года под наблюдением были самцы (n=181) и самки (n=230) линии CBRB в возрасте от 7 до 98 недель. Для сравнения использовали данные по самкам BLRB (n=480), самкам BALB/c (n=240) аналогичного возрастного диапазона. Каждая мышшь имела индивидуальную метку в течение всей жизни и рассматривалась как ветеринарный пациент. Еженедельно оценивали заболеваемость дерматитом по возрастным группам самок и самцов отдельно и следующие параметры индивидуально: 1) массу мышши (г); 2) степень выраженности изъязвлений кожи по 7-балльной шкале (0 – отсутствие изъязвлений, 1 – шелушение кожи без изъязвлений, 2–4 – поверхностные изъязвления, сходные с импетиго человека, 5–6 – глубокие язвы, сходные с экземой, 7 – симптоматика синдрома опшаренной кожи); 3) степень выраженности alopecии по 7-балльной шкале (0 – волосяной покров на спине не нарушен; 1 – нарушена только структура волоса, нет оголенных участков кожи; 2 – отсутствие шерстного покрова на 10–20 % площади; 3 – на 30–40 % площади; и т.д.); 4) площадь пораженного участка кожи спины, мм² (только alopecия, только изъязвления, или оба симптома). Образцы крови для цитологического анализа (стандартная окраска по Романовскому) и определения общего IgE в сыворотке (методом ИФА) получали под местной анестезией из ретроорбитального венозного синуса. Методом проточной цитометрии определяли соотношение субпопуляций лимфоцитов.

Результаты. Клинические проявления дерматита в форме изъязвлений и alopecии наблюдались у самок и самцов линий CBRB, тогда как у самок BLRB и BALB/c отмечалась только alopecия в более поздние сроки. В целом для мышшей CBRB степень выраженности симптомов усиливалась с возрастом для обоих полов. Наблюдался рецидивирующий характер изменения степени выраженности всех параметров дерматита, причем у самцов продолжительность безрецидивного периода уменьшалась с возрастом и была короче, чем у самок. В порядке убывания по уровню эозинофилов в крови линии мышшей располагались следующим образом: BALB/c=BLRB>CBRB. Показатели пойкилоцитоза, характерные для хронических заболеваний печени, коррелировали с возрастом у всех линий. Все линии мышшей демонстрировали высокие титры общего IgE и располагались в порядке убывания следующим образом: BLRB>CBRB>BALB/c. Значение иммунорегуляторного индекса (CD4/CD8) для мышшей CBRB было 2,5–3,0; повышение уровня могло свидетельствовать о высоком риске возникновению аутоиммунных процессов.

Выводы. Выявлена аллергическая природа рецидивирующего дерматита у всех трех линий мышшей (CBRB,

BLRB и BALB/c), при этом у CBRB клинические проявления наиболее выражены. Полученные результаты позволяют считать, что мыши этих линий с различной генетической предрасположенностью и степенью выраженности симптомов в совокупности являются комплексной биомоделью атопической экземы, осложненной микрофлорой (микробной экземы). Проведенное исследование позволило расширить границы применения 3С-парадигмы в области разработки новых многоуровневых биомоделей (по сравнению с одноуровневыми при стандартном подходе) для изучения инфекционно-аллергических заболеваний человека.

ВЛИЯНИЕ ДЛИТЕЛЬНОГО ПРИНУДИТЕЛЬНОГО ПОТРЕБЛЕНИЯ АЛКОГОЛЯ НА ИММУННУЮ СИСТЕМУ САМЦОВ КРЫС ВИСТАР ПРЕДПОЧИТАЮЩИХ И НЕ ПРЕДПОЧИТАЮЩИХ АЛКОГОЛЬ

Мхитаров В.А., Диатроптов М.Е., Симонова Е.Ю.

ФГБНУ «НИИ морфологии человека» РАМН, Москва, Россия

По данным литературы хроническое потребление алкоголя оказывает иммуносупрессорное действие. Однако, индивидуальные различия реакции иммунной системы на алкоголь в зависимости от дозы и характера потребления алкоголя не изучены.

Целью работы была сравнительная оценка состояния иммунной системы у крыс Вистар предпочитающих (ПП) и не предпочитающих алкоголь (НП) в условиях принудительного потребления. В экспериментальных группах животных определяли уровень продукции цитокинов спленоцитами, активированными конканавалином А, субпопуляционный состав лимфоцитов, фагоцитарную активность нейтрофилов периферической крови, оценивали морфофункциональное состояние тимуса и селезенки.

В условиях свободного выбора между питьевой водой и 15%-ным раствором этанола, из 40 самцов Вистар были выделены группы крыс, предпочитающих (n=9) и не предпочитающих алкоголь (n=11). Затем эти животные были помещены в клетки с одной поилкой с 15%-ным водным раствором этанола. Через 2 месяца крысы были введены из эксперимента передозировкой диэтилового эфира. В сыворотке крови методом ИФА определяли концентрацию кортикостерона (Assay Designs).

Уровень цитокинов - TGF- β , ИЛ-2, ИЛ-4, ИЛ-10, TNF- α , IFN- γ продуцируемых спленоцитами, активированными конканавалином А, определяли с помощью @ Bender MedSystems» (Австрия). Регистрация результатов проводилась на микропланшетном ИФА-анализаторе «ANTOS 2010» (Австрия). Подсчет спленоцитов и лимфоцитов в периферической крови проводили на гематологическом анализаторе «Celltac- α , MEK-6400» (Nihon Kohden С.). Фенотипический субпопуляционный состав лимфоцитов определяли на проточном цитофлюориметре «Cytomics FC-500» («Beckman Coulter») при помощи антител к CD3+, CD4+, CD8+, CD4+CD25+Foxp3+, CD4+CD25+Foxp3-, («Bioscience»). В гистологических препаратах тимуса, окрашенных гематоксилином и эозином, вычисляли отношение площади коркового и мозгового вещества и ширину субкортикальной зоны, в селезенке измеряли площадь ее поперечного сечения, вычисляли отношение площади белой и красной пульпы,

среднюю площадь ПАЛМ-зоны, лимфоидных узелков, их маргинальных зон и светлых центров.

Полученные цифровые данные обрабатывали с помощью статистического пакета «Statistica 6.1». В зависимости от характера распределения случайных величин, вычисляли медиану с квантилями (25%-75%) или среднюю арифметическую с ошибкой среднего. Сравнение групп производили методом множественного сравнения Mann-Whitney.

В условиях принудительного потребления алкоголя, в группе НП концентрация кортикостерона была статистически значимо снижена, а в группе ПП – повышена. Потребление алкоголя в обеих группах привело к повышению индекса отношения коркового/мозгового вещества и ширины субкапсулярной зоны, что соответствует акцидентальной инволюции I-II степени, развивающейся при стрессорных воздействиях. В группе крыс НП, по сравнению с контролем, статистически значимо снижался уровень кортикостерона в плазме крови, что коррелировало со снижением индекса CD4/CD8 и активацией Т-регуляторных клеток CD4+CD25+Foxp3+ и CD4+CD25+Foxp3-. В цитокиновом профиле отмечалось повышение T-x1 цитокина ИЛ-2. Размер селезенки уменьшался почти в 2 раза, площадь ее поперечного сечения равнялась 8,66 (7,52; 10,182) мкм², при 15,92 (15,53; 18,68) мкм² в контроле. Средняя площадь ПАЛМ-зоны, маргинальных зон, лимфоидных узелков и их светлых центров статистически значимо снижалась по сравнению с контролем. Концентрация кортикостерона у крыс группы ПП, напротив, была повышена, что сопровождалось активацией иммунного ответа по Tх-2 типу и запуском противовоспалительных реакций, о чем свидетельствовало повышение уровня ИЛ-4, ИЛ-10 и количества В-лимфоцитов. Фагоцитарный индекс в обеих группах был снижен, что отражает угнетение этого звена врожденного иммунитета.

Таким образом, у предпочитающих и не предпочитающих алкоголь животных уровень кортикостерона и реакция иммунной системы различаются – у животных ПП иммунный ответ поляризуется по Tх1, а у НП - по Tх2 типу.

ПРОТЕКТИВНЫЙ ЭФФЕКТ ЛИПОСОМ, ПОКРЫТЫХ ХИТОЗАНОМ И ЕГО АЦИЛИРОВАННЫМ ПРОИЗВОДНЫМ, ПРИ МОДЕЛИРОВАНИИ ЭНДОТОКСИМИИ У МЫШЕЙ

Набережных Г.А., Бахолдина С.И., Володько А. В., Давыдова В. Н.

Тихоокеанский институт биоорганической химии им. Г.Б. Елякова, ДВО РАН, Владивосток, Россия

Эндоотоксины грамотрицательных бактерий (ЛПС), проникая в кровотоки, взаимодействуют с многочисленными факторами иммунитета, и инициируют биосинтез комплекса эффекторных молекул, которые в больших дозах вызывают эндотоксический шок. Стратегия терапии шока основывается на удалении избыточного количества ЛПС и/или блокировании связывания эндоотоксина с рецепторами на клетках-мишенях. Ранее нами показано, что природные поликатионы хитозаны, образуя стабильные комплексы с анионными ЛПС и способны снижать токсическое действие ЛПС. В данной работе проведен сравнительный анализ защитных свойств при эндоотоксиновом шоке низкомолекулярного хитозана (Х-НМ, 4 кДа) и его ацилированного производного (Ац-Х-НМ)

ТАБЛИЦА (К ТЕЗИСАМ НАБЕРЕЖНЫХ Г.А. И ДР.)

Группа	Время введения	Группа препаратов	Выживаемость, %
1-я	1-кратное в/б введение ЛПС	Липосомы	20
2-я	2-кратное в/б введение 5мг/кг	Ац-Х-НМ	100
3-я	2-кратное в/б введение 5мг/кг, одновременно с ЛПС	Х-НМ	27
		Ац-Х-НМ	25
		Ац-Х-НМ+липосомы	30
4-я	2-кратное в/б введение 5 мг/кг, за 2 ч за 2 ч до ЛПС	Х-НМ	66
		Ац-Х-НМ	73
		Х-НМ+липосомы	90
		Ац-Х-НМ+липосомы	100
5-я	7-кратное п/о введение 2,5 мг/кг, затем ЛПС	Х-НМ	50
		Ац-Х-НМ	66
		Х-НМ+липосомы	76
		Ац-Х-НМ+липосомы	83

в растворах и в составе фосфолипидных липосом при внутрибрюшинном (в/б) и пероральном (п/о) введении мышам. Эндотоксический шок индуцировали в/б введением мышам ЛПС из *Escherichia coli* 055:B5 (7,5 мг/кг). Х-НМ и Ац-Х-НМ получали обработкой коммерческого хитозана. Хитолипосомы получали сорбцией Х-НМ и Ац-Х-НМ на липосомах, предварительно сформированных из лецитина, холестерина и дицетилфосфата. Установлено, что, введение Ац-Х-НМ повышает в 1.36-2 раза устойчивость липосом к агрессивному воздействию сред, моделирующих условия в некоторых отделах желудочно-кишечного тракта. Методом ИФА, показано, что комплекс ЛПС с ацилированным хитозаном снижает индукцию ФНО- α в крови человека на 40% по сравнению с ЛПС и комплекс не влияет на способность эндотоксина стимулировать клетки крови к выработке ИЛ-6.

Таким образом, профилактическое семикратное пероральное и двукратное внутрибрюшинное введение липосомальных форм хитозанов снижает токсическое действие эндотоксина на организм мышей и достоверно увеличивает выживаемости (83-100 %) животных в эксперименте.

ВЛИНИЕ НЕФРАКЦИОНИРОВАННЫХ МОНОНУКЛЕАРОВ КОСТНОГО МОЗГА НА МИТОГЕН - СТИМУЛИРОВАННУЮ ПРОЛИФЕРАЦИЮ СПЛЕНОЦИТОВ КРЫС

Нижегородова Д.Б., Кондратович Т.В., Юркевич М.Ю., Иванчик Г.И., Зафранская М.М.

Белорусская медицинская академия последипломного образования, Минск, РБ

Одним из наиболее активно изучаемых направлений в лечении социально-значимых заболеваний человека является использование клеточных технологий с применением культур мезенхимальных стволовых клеток (МСК), демонстрирующих выраженные *in vitro* и *in vivo* иммунорегуляторные свойства. Недостатком, ограничивающим возможности использования терапии на основе МСК при острых состояниях с выраженным воспалительным компонентом (инсульт, инфаркт, острый респираторный дистресс-синдром и др.), является длительное время культи-

вирования МСК (до нескольких недель) для получения достаточной клеточности культуры. В качестве перспективной альтернативы выступают нефракционированные мононуклеары костного мозга (МоКМ).

Цель исследования. Провести сравнительную оценку антипролиферативного действия МоКМ и МСК на модели *in vitro* совместного культивирования митоген-индуцированных спленоцитов крыс с клеточными культурами.

Материалы и методы. Предварительно окрашенные 5(6) - карбоксифлуоресцеином (CFSE) спленоциты крыс (n=15) культивировали с конконвалином А (1мкг/мл КонаА) и МоКМ в соотношении спленоциты:МоКМ 1:1, 1:2, 1:5, 1:10, а также с МСК в соотношении 1:10. Регистрацию результатов клеточного деления осуществляли на проточном цитофлуориметре FC500 («Beckman Coulter», Германия). Статистический анализ данных проводился с использованием пакета прикладных программ Statistica 8.0.

Результаты. Максимальный супрессивный эффект МоКМ на КонаА-стимулированную пролиферацию спленоцитов наблюдался при кокультивировании спленоцитов с МоКМ в соотношении 1:2. Индекс супрессии составлял 93,5 (87,3÷94,9) %. При этом не установлено различий между полученными данными и доказанным ранее антипролиферативным эффектом МСК, $p=0,92$. Индекс супрессии митоген-стимулированных спленоцитов в присутствии МСК соответствовал 91,1 (86,9÷93,8) %. Добавление в культуру активированных спленоцитов МоКМ в соотношении 1:5 и 1:10 не приводило к ингибированию пролиферативного ответа клеток.

Заключение. Нефракционированные МоКМ оказывают выраженное *in vitro* антипролиферативное действие на КонаА-стимулированные спленоциты крыс, сопоставимое с иммуносупрессивным действием МСК, что открывает перспективу применения МоКМ в терапии острых состояний с воспалительным компонентом для предотвращения отдаленных последствий ишемического поражения органов.

ИНДУЦИРОВАННЫЙ ЦИКЛОФОСФАНОМ ГЕМОИММУНОДЕФИЦИТ

Никольский И.С., Никольская В.В., Чех Д.Л.

*Институт генетической и регенеративной медицины
НАМН, Киев, Украина*

Известно, что в первые дни после введения мышам циклофосфана (ЦФ) наблюдается глубокое угнетение структуры и функций иммунной системы, что означает развитие иммунодефицита. Однако, в связи с интенсивно развивающимися представлениями о роли гемопоэтических стволовых клеток (ГСК) в формировании иммунной системы, существенно дополняющими данные о дочернем положении иммунной системы по отношению к кроветворной, целесообразно оттенить роль в развитии некоторых иммунодефицитов недостаточности кроветворения, то есть, наметить положение о гемоиммунодефиците, что определит и его практическое значение, которое может заключаться в разработке методов клеточной иммуноотерапии с использованием ГСК.

Исследования проведены на 66 мышах СВА и нелинейных. ЦФ вводили в/б в количестве 200 мг/кг массы тела. Структурные и функциональные тесты проводили на 1-й, 4-й, 7-й и 12-й день после инъекции. Часть животных за 5 дней до опыта иммунизировали в/б 10^8 эритроцитов барана (ЭБ), а за день до него в подушечку задней лапы делали разрешающую инъекцию (10^8 ЭБ). Апоптоз и клеточный цикл изучали с использованием пропидия йодида методом проточной цитофлуориметрии. АОК определяли методом локального гемолиза в геле.

Если в течение первой недели после введения ЦФ клеточность костного мозга, селезенки и тимуса уменьшалась в 3-4 и более раз, то изменения в лимфатических узлах мышей были существенно менее выражены. Число лимфоцитов в апоптозе на 4-й день оказалось сниженным, и даже меньшим, чем в норме ($0,9 \pm 0,1\%$ против $1,8 \pm 0,3\%$; $p < 0,05$). Процент лимфоцитов в G2-M+S фазах клеточного цикла несколько уменьшался (с $18,3 \pm 2,0\%$ до $11,9 \pm 1,0\%$; $p < 0,05$), а относительное количество клеток лимфатических узлов в G0/G1 фазах при этом увеличивалось, но также незначительно (с $81,7 \pm 2,4\%$ до $88,1 \pm 1,1\%$; $p < 0,05$). С 7 по 12 день, когда происходило существенное увеличение клеточности костного мозга и, в определенной степени, селезенки, наблюдали хорошо известное явление мобилизации ГСК, так называемый овершут, сопровождающийся значительным (в разы) увеличением в крови содержания лейкоцитов, гранулоцитов, лимфоцитов, моноцитов и тромбоцитов. На 7-й день число лимфоцитов увеличивалось до 11000 ± 3700 /мкл с 1300 ± 200 /мкл на 4-й день ($p < 0,05$). Усиление костномозгового кроветворения сопровождалось существенным увеличением клеточности селезенки, нормализацией пролиферативной активности клеток лимфатических узлов, а также частичным восстановлением гуморального иммунного ответа ($2,8 \pm 1,0 \times 10^3$ против $7,2 \pm 2,0 \times 10^3$ АОК/селезенку в норме). Реакция ГЗТ на 12-й день оставалась ниже нормы (индекс — $6,7 \pm 1,5$ против $14,0 \pm 1,5$; $p < 0,05$).

Полученные данные, вкуче с литературными, могут свидетельствовать о ведущем значении в развитии циклофосфанового иммунодефицита поражения кроветворения. По-видимому существенное значение в регенерации иммунной системы играет мобилизация из костного мозга, в определенный момент восстановления гемопоэза, ГСК, лимфоидных и миелоидных элементов.

БИОИНЖЕНЕРИЯ ИСКУССТВЕННЫХ ЛИМФОИДНЫХ ОРГАНОВ

Носенко М.А.^{1,2}, Атретханы К.-С.Н.^{1,2},
Архипова А.Ю.², Мойсенович М.М.², Зварцев Р.В.¹,
Друцкая М.С.¹, Недоспасов С.А.^{1,2}

¹ Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта Российской академии наук, Москва, Россия

² Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, биологический факультет, Москва, Россия

Создание искусственных лимфоидных органов является актуальной проблемой, так как позволит решить многие вопросы, связанные с развитием и работой иммунной системы, а также может иметь клиническое значение. Запрограммированные определенным образом, такие системы могут модулировать направление иммунного ответа, что является многообещающей терапией при лечении многих иммунозависимых заболеваний, таких как рак, аутоиммунные заболевания, инфекции, аллергические и иммунодефицитные состояния. При этом для их полноценной функциональности крайне важна правильная пространственная организация всех необходимых компонентов, что является основной задачей биоинженерии любых искусственных органов.

В качестве структурного каркаса для таких систем сейчас используются матриксы на основе различных биополимеров. В нашей работе были использованы фиброинные матриксы, изготавливаемые на кафедре биоинженерии МГУ. Была изучена биосовместимость этих матриксов в экспериментах *in vitro* и *in vivo*. Используемый материал способствовал росту первичной клеточной культуры мышинных эмбриональных фибробластов, а также не вызывал каких-либо признаков локального или системного воспаления при подкожной имплантации мышам линии Balb/C и C57Bl/6, что характеризует его как подходящий для потенциального применения в клинике.

Для моделирования искусственных лимфоидных органов были получены и охарактеризованы различные культуры иммунных клеток. Для получения флуоресцентно-меченных клеток использовались линии мышей, несущие трансгены GFP или RFP. Дендритные клетки получали с помощью *in vitro* дифференцировки в первичной культуре костномозговых предшественников мыши под воздействием ростового фактора GM-CSF. Далее зрелые клетки активировали LPS. С помощью метода проточной цитометрии было показано, что полученная культура была обогащена дендритными клетками (>90%), все они имели повышенную экспрессию молекул гистосовместимости второго класса (MHCII), и около половины из них несли на поверхности хемокиновый рецептор CCR7, в норме необходимый для их миграции в дренирующий лимфоузел. Способность клеток к миграции под влиянием специфического хемокина CCL19 была далее показана в эксперименте *in vitro* хемотаксиса. Был разработан протокол получения и культивирования стромальных клеток лимфоузлов, необходимых для полноценного функционирования органа, привлечения в него других иммунных клеток и обеспечения их взаимодействия. Стромальные клетки выделяли из нормальных лимфоузлов мыши, изучали при помощи метода проточной цитометрии и культивировали в течение 2-3 недель. Полученная культура

была обогащена лимфатическими эндотелиальными клетками, играющими важную роль в миграции в лимфоузлы антигенов и активированных дендритных клеток. Также в культуре присутствовали другие стромальные клетки, но их количество уменьшалось со временем культивирования, что может быть объяснено необходимостью добавления дополнительных специфических факторов для их роста. Лимфоциты выделяли из нормальных лимфатических узлов или селезенки мышей дикого типа или трансгенных мышей, экспрессирующих RFP в CD4+ клетках.

Далее иммунные клетки использовали для создания трехмерных культур на основе фиброинозных матриксов. Одновременное заселение матриксов дендритными клетками и лимфоцитами приводило к их взаимодействию. Нанесение лимфоцитов на матрикс, предварительно заселенный культурой стромальных клеток, приводило к формированию конгломератов CD4+ клеток внутри матрикса. Полученные системы являются интересными объектами для дальнейших исследований и требуют тщательной *in vivo* проверки своей функциональной активности.

Работа была осуществлена при поддержке гранта РФФИ 14-04-01799 и при поддержке Минобрнауки РФ по соглашению о предоставлении субсидии от 27 ноября 2014 г. №14.604.21.0148 (уникальный идентификатор соглашения RFMEFI60414X0148).

СУБПОПУЛЯЦИОННЫЙ СОСТАВ И ПОКАЗАТЕЛИ ГИБЕЛИ ЛИМФОЦИТОВ ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ХРОНИЧЕСКОЙ ПОЧЕЧНОЙ НЕДОСТАТОЧНОСТИ

Осиков М.В., Черепанов Д.А.

ГБОУ ВПО «Южно-Уральский государственный медицинский университет» Минздрава России, Челябинск

Ранее нами было продемонстрировано, что при терминальной стадии хронической почечной недостаточности (ХПН) наблюдается депрессия адаптивного иммунитета и развиваются связанные с ней инфекционные заболевания, злокачественные опухоли, низкий ответ на вакцинацию, что снижает качество и продолжительность жизни больных с ХПН, находящихся на заместительной почечной терапии. Вторичный иммунодефицит, включающий лимфоцитопению и др. признаки, может быть обусловлен гибелью лимфоцитов в крови путем апоптоза и некроза. Цель работы – исследовать субпопуляционный спектр лимфоцитов в периферической крови и показатели гибели лимфоцитов путем некроза и апоптоза при экспериментальной ХПН.

Материалы и методы исследования. Исследование выполнено на 24 белых нелинейных половозрелых крысах. ХПН у крыс ($n=12$) моделировали путем двухэтапной оперативной резекции 5/6 почечной ткани, ХПН развивалась на 21 сутки, для верификации определяли концентрацию в сыворотке креатинина, мочевины. Группа контроля – ложнопериоперированные животные ($n=12$). Количество лейкоцитов в крови и лейкоцитарную формулу определяли общепринятыми методами. Экспрессию антигенов CD45RA, CD3 на лимфоцитах периферической крови определяли методом прямого иммунофлуоресцентного окрашивания клеток цельной крови с использованием моноклональных антител CD45RA (клон ОХ-33) – экспрессируется на В-лимфоцитах, моноцитах,

наивных Т-клетках; CD3 (клон 1F4) – экспрессируется на Т-лимфоцитах. Гибель лимфоцитов оценивали при окрашивании клеток конъюгированным с флюорохромом аннексином V (Annexin-5-FITC) и 7-аминоактиномицином D (7-AAD) («Beckman Coulter», США) с дифференцировкой интактных клеток (Annexin-5-FITC-/7-AAD-), клеток с ранними признаками апоптоза (Annexin-5-FITC+/7-AAD-) и признаками некроза (Annexin-5-FITC+/7-AAD+). Анализ окрашенных клеток проводили на проточном цитофлуориметре «Navios» («Beckman Coulter», США).

Результаты исследования. Установлено, что при экспериментальной ХПН в периферической крови крыс развивается лимфоцитопения ($2,64 \pm 0,20 \cdot 10^9/\text{л}$; в контроле $4,27 \pm 0,41 \cdot 10^9/\text{л}$; $p < 0,05$). Анализ популяционного спектра лимфоцитов выявил снижение количества CD45+ лимфоцитов ($1,00 \pm 0,11 \cdot 10^9/\text{л}$; в контроле $2,22 \pm 0,21 \cdot 10^9/\text{л}$; $p < 0,05$) и CD3+ лимфоцитов ($1,42 \pm 0,12 \cdot 10^9/\text{л}$; в контроле $3,14 \pm 0,18 \cdot 10^9/\text{л}$; $p < 0,05$). При ХПН увеличивается количество лимфоцитов с ранними признаками апоптоза ($13,60\% \pm 1,07\%$; в контроле $6,66\% \pm 1,88\%$; $p < 0,05$) и признаками некроза ($0,96\% \pm 0,14\%$; в контроле $0,16\% \pm 0,06\%$; $p < 0,05$) и как следствие снижается количество интактных клеток ($85,44\% \pm 1,18\%$; в контроле $93,66\% \pm 1,23\%$; $p < 0,05$). С использованием корреляционного анализа установлено наличие обратной связи между количеством CD45+ лимфоцитов и количеством лимфоцитов с ранними признаками апоптоза ($R = -0,64$; $p < 0,05$) и признаками некроза ($R = -0,51$; $p < 0,05$), а также между количеством CD3+ лимфоцитов и количеством лимфоцитов с ранними признаками апоптоза ($R = -0,73$; $p < 0,05$) и признаками некроза ($R = -0,69$; $p < 0,05$).

Таким образом, при экспериментальной ХПН в периферической крови снижается общее количество лимфоцитов, а также количество клеток, несущих маркеры Т-лимфоцитов и В-лимфоцитов. При ХПН увеличивается количество лимфоцитов в крови с ранними признаками апоптоза и признаками некроза. Количество клеток с маркерами Т-лимфоцитов и В-лимфоцитов снижается по мере увеличения количества клеток с ранними признаками апоптоза и признаками некроза. Полученные результаты констатируют, что при экспериментальной терминальной ХПН, исключая влияние сторонних факторов (фармакотерапия, гемодиализ и др.) снижение количества Т- и В-лимфоцитов обусловлено их гибелью путем некроза и/или апоптоза.

ДИНАМИКА ИЗМЕНЕНИЙ ПЛОТНОСТИ ПРОСТРАНСТВЕННОГО РАСПРЕДЕЛЕНИЯ ТКАНЕВЫХ БАЗОФИЛОВ ЩИТОВИДНОЙ ЖЕЛЕЗЫ В ПОСТЛАКТАЦИОННОМ ПЕРИОДЕ

Параскун А.А., Виноградов С.Ю., Штойко М.А., Ивин А.А.

ГБОУ ВПО ИвГМА Минздрава РФ, Иваново, Россия

Известно, что женщины в 10 раз чаще, чем мужчины, страдают от тиреоидных нарушений. В последние годы распространенность этих заболеваний у женщин во время беременности и лактации увеличивается. Щитовидная железа играет важную роль в регуляции процессов жизнедеятельности организма. Она контролируется двумя тесно взаимосвязанными системами: трансагипофизарной и нервнопроводниковой. Наряду с этим в поддержании внутриоргана гомеостаза щитовидной железы прини-

мают участие тканевые базофилы (тучные клетки), которые накапливают и выделяют широкий спектр биологически активных веществ (гистамин, гепарин, серотонин, катехоламины, цитокины, липидные медиаторы и др.). Тем самым, регулируя пролиферацию клеток, их дифференцировку, функциональную активность, межклеточные взаимодействия, как в норме, так и в условиях воспаления, регенерации и при развитии иммунных реакций. Цель исследований – оценка динамики плотности пространственного распределения тканевых базофилов (ТБ) шитовидной железы крыс в постлактационном периоде. Работа выполнена на 36 здоровых беспородных крысах – самках зрелого репродуктивного возраста. Сроки эксперимента составили 2, 7, 14, 21, 28 сутки после лактации. Исследования с животными проводили в соответствии с «Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных» (Приказ №724 Минвуза от 13.11.1984 г.). После забоя у крыс отделяли обе доли шитовидной железы. Одна доля сразу же подвергалась криостатному микромиранию, а другая – парафиновой проводке. Для оценки плотности пространственного распределения тканевых базофилов криостатные срезы толщиной 20 мкм окрашивали альциановым синим-сафранином в прописи J. Desaga и изучали с помощью микроскопа Биолам (об. 90, ок. 10). Подсчитывали количество тканевых базофилов в поле зрения (10 полей зрения – 1 варианта статистического массива) отдельно в центральных и периферических зонах железы. При анализе результатов тучные клетки были разделены на основе сродства гранул к тому или иному красителю на 3 группы: 1. альцианофильные, окрашивающиеся только альциановым синим; 2. миксные, содержащие альцианофильные и сафранинофильные гранулы; 3. сафранинофильные, окрашивающиеся сафранином. Статистическая обработка материала проводилась с использованием интерпрограммы «Microsoft Excel 2010». Выявлено, что тканевые базофилы чаще всего располагаются около кровеносных сосудов, нередко тесно примыкают к базальной мембране фолликулов и перифолликулярных капилляров. Плотность пространственного распределения ТБ на протяжении всего эксперимента волнообразно изменяется в периферической зоне, но остается без изменений в центре железы. При анализе дифференциальной окраски было установлено достоверное преобладание молодых форм клеток (миксных и альцианофильных ТБ). Плотность сафранинофильных (зрелых) тучных клеток минимальна, за исключением 2 суток испытаний. Ранговый корреляционный анализ демонстрирует хроносопряженность изменений плотности пространственного распределения ТБ и морфофункциональных параметров шитовидной железы.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ИЗУЧЕНИЕ ВОЗДЕЙСТВИЯ АНТИГЕНОВ ASPERGILLUS FLAVUS НА РЕАКТИВНОСТЬ ИЗОЛИРОВАННЫХ СЕГМЕНТОВ ТОНКОЙ КИШКИ, СОДЕРЖАНИЕ И ФУНКЦИОНАЛЬНУЮ АКТИВНОСТЬ НЕЙТРОФИЛЬНЫХ ЛЕЙКОЦИТОВ У ЖИВОТНЫХ

Пастушенков В.Л., Митин Ю.А., Углина О.А.

Военно-медицинская академия им. С.М. Кирова, Санкт-Петербург, Россия

Введение. Заболевания, в патогенезе которых существенную роль играют изменения иммунной системы, в настоящее время представляют серьезную проблему

здравоохранения. Научные исследования показали возможности разнообразного антигенного воздействия на организмы человека и животных, обусловленного грибковыми антигенами. Так, грибы рода *Aspergillus flavus* (Af), характеризуются наличием более чем 300 антигенных компонентов, среди которых наиболее значимыми являются антигены мицелия. В иммунной системе животных и человека под действием антигенов грибов рода *Aspergillus flavus* могут развиваться различные патологические процессы, сопровождающиеся изменениями содержания и функциональной активности нейтрофильных лейкоцитов, а также характером и уровнями воспаления органов и тканей. В то же время недостаточно научных исследований, в которых были бы освещены вопросы таких изменений, возникающих под влиянием антигенов грибов рода *Aspergillus flavus*. Именно поэтому было проведено данное исследование.

Цель и задачи исследования. Экспериментальное изучение воздействия антигенов *Aspergillus flavus* на реактивность изолированных сегментов тонкой кишки, содержание и функциональную активность нейтрофильных лейкоцитов у животных.

Материалы и методы. В экспериментальных исследованиях был использован штамм *Aspergillus flavus* F-1118, выделенный в лаборатории живых культур грибов Российского центра по глубоким микозам г.Санкт-Петербурга. Экспериментальные исследования были проведены на 76 (47 опытных 29 контрольных) кроликах породы Шиншилла массой от 2,8 до 3,0 кг. Длительность наблюдения за животными составила 16 недель. С целью исключения воздействия на животных токсических метаболитов, в первую очередь афлотоксинов *Aspergillus flavus*, появляющихся с 8 дня выращивания грибов на среде Сабурова, выделение антигенов из среды проводилось только с 1 по 7 день роста грибов. Для выявления антигенной активности *Aspergillus flavus* (Af) использовали ежедневное введение фильтрата Af в ротовую полость животных, а в изолированные лигатурами сегменты тонкой кишки кроликов вводили взвесь, а также фильтрат грибов Af, полученный из среды Сабурова после выращивания на ней *Aspergillus flavus*.

Основные результаты. В результате ежедневного введения фильтрата Af в ротовую полость животных через 1 неделю отмечалось развитие абсолютной лейкопении: содержание лейкоцитов у животных опытной группы составило $2,7 + 0,10 \times 10^9$ против $7,9 + 0,11 \times 10^9$ у животных контрольной группы. Достоверное ($p < 0,05$) снижение числа лейкоцитов сохранялось до 16 недели наблюдения. Индекс созревания нейтрофилов у животных опытной группы в течение всего времени эксперимента был достоверно снижен. Максимальное снижение отмечалось на 3 месяц эксперимента ($0,37 + 0,05$ у.е. у животных опытной группы и $0,76 + 0,04$ у.е. у животных контрольной группы). Показатель базальной фагоцитарной активности у животных опытной группы в начале эксперимента был достоверно снижен ($13,8 + 1,6\%$), однако к исходу 8 недели эксперимента он вырос ($30,4 + 2,13\%$), достигнув значений, достоверно не различающихся с аналогичным показателем контрольной группы ($32,0 + 1,4\%$). В эксперименте воздействовали на изолированные лигатурами сегменты тонкой кишки кроликов фильтратов грибов Af, выделенных от здоровых и больных острой дизентерией детей. Из 45 штаммов, 19 вызывали резко положительную, 16 – положительную, 10 – отрицательную реакцию тканей. Для положительной реакции была характерна

различной степени гиперемия и дилатация тканей изолированных сегментов тонкой кишки, а при резко положительной реакции экссудат, находящийся в просвете тонкой кишки, содержал примеси слизи и крови

Заключение. Таким образом, экспериментальные данные подтверждают патогенетическое значение воздействия антигенов *Aspergillus flavus* на состояние внутренних органов и тканей, в частности тонкой кишки, содержание и уровень функциональной активности нейтрофильных лейкоцитов у животных.

СРАВНЕНИЕ СВОЙСТВ СТРОМАЛЬНЫХ КЛЕТОК ЖИРОВОЙ ТКАНИ И ДЕДИФФЕРЕНЦИРОВАННЫХ АДИПОЦИТОВ

Пиневич А.А.^{1,2}, Самойлович М.П.^{1,2}, Терехина Л.А.¹, Крутецкая И.Ю.¹, Климович В.В.¹

¹ ФГБУ Российский научный центр радиологии и хирургических технологий, Санкт-Петербург, Россия
² ФГБОУ ВПО Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия

Стромальные клетки жировой ткани (СКЖТ) обладают высокой пролиферативной активностью и способностью к мультилинейной дифференцировке. Зрелые адипоциты в условиях «потолочного» культивирования (Sugihara et al., 1986) превращаются в дедифференцированные адипоциты (ДДА), фибробластоподобные элементы, обладающие признаками стволовых клеток. В ряде исследований популяция ДДА характеризуется как более гомогенная и стабильная, чем популяция СКЖТ.

Цель работы состояла в сравнении морфологических, иммунофенотипических, ростовых и дифференцировочных характеристик СКЖТ и ДДА, выделенных из жировой ткани одного донора.

СКЖТ выделяли по стандартной методике из околопочечной жировой ткани пациента с солидной опухолью. Зрелые адипоциты отделяли от СКЖТ путем центрифугирования и помещали в герметично закрытые флаконы, заполненные ростовой средой доверху. При культивировании в таких условиях в течение трех недель адипоциты всплывали, прикреплялись к «потолочной» поверхности, постепенно теряли липидные включения и приобретали фибробластоподобную морфологию, свойственную ДДА. Одновременно часть клеток отделялась от «потолочной» поверхности и прикреплялась ко дну флакона («донная» культура). Клетки, прикрепившиеся к верхней и нижней поверхностям флаконов, переседали и культивировали раздельно.

Были исследованы ростовые характеристики и способность клеток всех культур к дифференцировке в адипогенном направлении. «Донная» культура изначально обладала фибробластоподобной морфологией. Морфология ДДА сохранялась неизменной в ходе дальнейших пассажей.

На ранних пассажах время удвоения СКЖТ и клеток «донной» культуры было одинаковым и составляло 38–40 ч. Время удвоения ДДА превышало 90 ч. При культивировании до четвертого пассажа этот показатель у СКЖТ возрастал до 48 ч, у «донной» культуры – до 114 ч, а у ДДА уменьшался до 26 ч.

Фенотипические характеристики клеток исследовали методом проточной цитофлуориметрии. По фенотипу все три культуры отвечали критериям, принятым для стволо-

вых клеток. Доля клеток, несущих антигены CD29, CD44, CD73, CD90, CD105 и CD166 во всех трех популяциях превышала 96%. Ни в одном из образцов не было выявлено экспрессии маркеров CD45, CD62E и HLA-DR. ДДА и клетки «донной» культуры не несли на поверхности антиген CD34, являющийся маркером гемопоэтических стволовых клеток. Доля CD34-позитивных клеток в СКЖТ составляла 2%. Доля клеток, несущих молекулу адгезии CD54, в популяциях СКЖТ и ДДА составляла 83–85%. В «донной» культуре этот показатель не превышал 63%.

Медиана интенсивности флуоресценции (показатель, отражающий плотность маркерных молекул на поверхности клеток) была одинаковой во всех трех изученных культурах. Исключение составлял маркер CD44, ассоциированный со стромальными клетками, плотность которого на элементах «донной» культуры была вдвое выше, чем на клетках СКЖТ и ДДА.

СКЖТ, ДДА и клетки «донной» культуры обладали способностью к индуцированной дифференцировке в адипогенном направлении вне зависимости от срока культивирования. Спонтанной адипогенной дифференцировки не происходило ни в одной из культур. Уровень содержания липидов, экстрагированных из клеток, был максимален в культуре ДДА, а клетки «донной» культуры накапливали наименьшее количество липидов.

Таким образом, культура ДДА, полученных путем «потолочного» культивирования, по иммунофенотипическим свойствам сходна с СКЖТ, однако обладает более высокой пролиферативной активностью и способностью к адипогенной дифференцировке. Клетки «донной» культуры, напротив, обладают пониженной пролиферативной активностью и отличаются от СКЖТ и ДДА уровнем экспрессии ряда антигенных маркеров.

ЭФФЕКТ ПРЕПАРАТОВ ИНТЕРФЕРОНОВ (ИФН) И ИНДУКТОРОВ ИФН НА ЭКСПРЕССИЮ TLR-ГЕНОВ И CD-РЕЦЕПТОРОВ В КЛЕТОЧНОЙ ЛИНИИ ТНР-1

Полосков В.В., Бузова О.С.¹, Шувалов А.Н., Соколова Т.М.

ФГБУ «ФНИЦ ЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» МЗ РФ, Москва, Россия

¹ ФГБНУ «РОИЦ им. Н.Н. Блохина», Москва, Россия

Введение: Сигнальные реакции иммунного ответа начинаются с рецепторов врожденного иммунитета. Активация генов TLR-рецепторов повышает их уровни на поверхности и в эндосомах клеток, что делает клетки более резистентными к инфекционным патогенам и чувствительными к апоптозу. Опухолевые линии клеток имеют характерные изменения в иммунных ответах, обусловленные уровнями их дифференцировки. На клеточной линии моноцитарного лейкоза (ТНР-1) действие препаратов ИФН и индукторов ИФН на транскрипцию TLR-генов и представленность CD-рецепторов изучено очень ограничено и не взаимосвязано. Вместе с тем, эти человеческие клетки представляют большой интерес как модель для оценки действия противовирусных и противоопухолевых препаратов, т.к. они могут быть дифференцированы в макрофаги.

Цель и задачи: Показать в клетках острого моноцитарного лейкоза (ТНР-1) стимуляцию генной активности группы известных TLR-генов добавлением препаратов

ИФН 1-типа и отечественных индукторов ИФН и сопоставить изменения генной активности с влиянием препаратов на уровне широкого спектра CD-рецепторов.

Материалы и методы: Перевиваемая линия клеток ТНР-1 (острый моноцитарный лейкоз, АТСС-Т1В-202 получена из РОНЦ им. Н.Н. Блохина). Препараты ИФН: Реаферон -ИФН-альфа 2 («Фармапарк» и «Вектор-Медика» Россия), Инфибета -ИФН-бета (ЗАО «Лекко»), Генфаксон-ИФН-бета (Аргентина). Индукторы: Ридостин (дрожжевая дсРНК «Диафарм» Россия); Циклоферон (меглумина акридоноацетат «Полисан», Россия); иммуномодулятор Иммуномакс (кислый пептидогликан «Иммафарма» Россия). Время инкубации клеток с препаратами 48 ч. (для ОТ-ПЦР) и 4 дня (для проточной цитометрии) при 37°C. Количественная ОТ-ПЦР в режиме реального времени ставилась на приборе BioRad CFX-96 с рассчитанными парами олигонуклеотидных праймеров. Проточная цитометрия проводилась с мечеными FITC и PE моноклональными антителами (BD Bioscience) на приборе FACSCantoII, Becton Dickinson.

Основные результаты: В клетках ТНР-1 конститутивные уровни экспрессии TLR-рецепторов (TLR-2, TLR-3, TLR-4, TLR-7, TLR-8 и TLR-9) были на низком уровне (пороговые циклы амплификации $C_q = 40-45$). Дополнительно была определена активность протонкогена Bcl-2 и гена транскрипционного фактора NFkB, которые характеризовались в клетках ТНР-1 повышенной активностью. Напротив активность гена ИФН-гамма была не выявляемой.

Исследованные препараты (Ридостин 100 мкг/мл, Инфибета 10^{3-5} МЕ/мл, Иммуномакс 4-10 МЕ/м и Циклоферон 125 мкг/мл) в нетоксических дозах оказывали стимулирующее действие на вышеперечисленные гены TLR-рецепторов и активировали ген NFkB. При этом наиболее выраженным эффектом обладал препарат Ридостин (кратность стимуляции более 1000 раз). Препараты Иммуномакс и Циклоферон также вызывали достоверные увеличения активности этих генов, но на порядок ниже. Не обнаружено стимулирующего действия на гены TLR и NFkB препаратов Реаферон и Генфаксон, но они индуцировали в клетках ТНР-1 транскрипцию гена ИФН-гамма. Свойственные моноцитам CD-11b и CD-14 имели в клетках ТНР-1, соответственно, значения 1,5% и 65,4%. Под влиянием препаратов Ридостин, Реаферон, Циклоферон и Иммуномакс уровень CD-14 заметно увеличивался до 80% и более, тогда как рост CD-11b был незначительным (3-4%). Уровень представленности апоптозного рецептора CD-95 под влиянием препаратов существенно не изменялся и оставался на уровне 20-30%. Исходно высокие уровни (>80%) на поверхности клеток ТНР-1 имели CD-3, CD-5, CD-13, CD-45, CD-23 и на них добавление препаратов не влияло. Наибольшие изменения в активности наблюдались у CD-4, CD-7 и CD-33. Препараты повышали их уровни представленности в 1,5-2 раза. Антиген комплекса HLA-DR заметно увеличивался только в ответ на внесение препарата Реаферон.

Заключение: Получены новые данные о влиянии препаратов ИФН типа 1 и индукторов ИФН на свойства клеточной линии ТНР-1, которые свидетельствуют о возможности коррекции ими реакций дифференцировки и взаимосвязи с активацией TLR-генов на клеточном уровне.

ИММУНОСТИМУЛИРУЮЩЕЕ ДЕЙСТВИЕ ДНК

Полторак А.

Тафтс Университет, Бостон, США
Петрозаводский Университет, Карелия,

Несмотря на то, что иммуностимулирующие свойства цитозольный ДНК были известны относительно давно, только в течение последних лет была выявлена и изучена молекулярные основы врожденного иммунного ответа на ДНК. В частности, было описано, как ДНК микробного или хозяйского происхождения индуцирует интерферон типа I, который занимает центральное место в противовирусных ответах и опосредовании аутоиммунных заболеваний. Распознавание и ответ на ДНК бажен не только в ранней защите от инфекций, но и в активации приобретенного (адаптивного) иммунного ответа. На сегодняшний день охарактеризовано более десяти рецепторов, способных распознавать цитозольную ДНК. Среди них, центральное место отводится так называемому адаптеру СТИНГУ (STING), который может не только передавать сигнал и активировать другие компоненты врожденного иммунитета в ответ на ДНА, но и непосредственно распознавать внутриклеточную ДНК клетки-хозяина или патогена. Именно поэтому СТИНГ является ключевым компонентом в иммунных ответах на ДНК, механизм активации, которые только сейчас начинают изучаться и характеризоваться. В данном докладе будут представлены последние достижения в понимании механизмов, активируемых цитозольной ДНК. Будет также указана роль иммунных ответов на ДНК в инициации аутоиммунных заболеваний. Будет представлена модель регуляции этих иммунных ответов, которая обеспечивает быстрый и нормированный иммунный ответ и позволяет избежать патологических реакций таких как аутоиммунные заболевания. Будут также перечислены важные вопросы, которые сейчас необходимо решать в области врожденного иммунитета активации ДНК.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ МОДЕЛЬ СИНДРОМА «СУХОГО ГЛАЗА» НА ПОЧВЕ СНИЖЕНИЯ СЛЕЗОПРОДУКЦИИ У КРОЛИКОВ ПОРОДЫ ШИНШИЛЛА

Попов В.Ю.¹, Калинина Н.М.², Бржецкий В.В.¹

¹ ГБОУ ВПО «Санкт-Петербургский государственный педиатрический медицинский университет»
Министерства Здравоохранения Российской Федерации,
Санкт-Петербург, Россия

² ФГБУ Всероссийский центр экстренной
и радиационной медицины им. А.М. Никифорова МЧС
России, Санкт-Петербург, Россия

Введение. Проблема синдрома «сухого глаза» (ССГ), которым страдают десятки миллионов людей, продолжает оставаться в центре внимания офтальмологов во всем мире. В силу этого, создание экспериментальных моделей ССГ для изучения патогенеза, клинических проявлений и разработки новых лекарственных средств в настоящее время является весьма актуальным. Экспериментальное моделирование затрагивает как внешние, так и внутренние (иммунные, эндокринные, нейрогенные) факторы, участвующие в развитии ССГ. По данным зарубежной литературы, все большее внимание в рассматриваемом отношении привлекают модели, основанные на приме-

нении ботулинического токсина, снижающего слезопродукцию. Имеются данные о периорбитальном, трансконъюнктивальном введении в основную слезную железу кролика различных концентраций ботулотоксина-А (БТ-А), вызывающих местные проявления ССГ, которые сохранялись до 3-4 месяцев, без системных побочных эффектов. Известно, что ботулинический токсин является блокатором высвобождения ацетилхолина из пресинаптических терминалей холинергических нейронов, что сопровождается снижением секреции, в том числе и в слезных железах. Вместе с тем, выраженность клинических проявлений ксероза у таких кроликов оставалась недостаточной, вероятно, из-за выбора в качестве мишени препарата только одной (основной) слезной железы животного.

Цель. Модификация ранее предложенной экспериментальной модели, предусматривающей более выраженное снижение слезопродукции и, соответственно, ксероз эпителия глазной поверхности.

Материал и методы. Исследование проведено на 10 кроликах (20 глаз) породы Шиншилла, массой 2,5-3кг. В условиях эфирной анестезии были выполнены трансконъюнктивальные инъекции 5ЕД БТ-А (Botox, Allergan, Inc., Irvine, CA) с помощью иглы 29G в слезную железу, локализирующуюся в верхнее-наружном отделе глазницы, слезную железу третьего века (Гардерова железа) - во внутреннем углу глаза, а также в подглазничную железу - в параорбитальной области снизу.

На 1,3,7,14,21-й дни исследования проводили оценку функциональных параметров: стабильности прероговичной слезной пленки - пробой по М. Ногн, суммарной слезопродукции - по О. Schirmer, а также, в ходе биомикроскопии эпителия глазной поверхности, степени его окрашивания раствором лиссаминового зеленого по шкале van Bijsterveld. Сохранение в слезной жидкости цитокинов IL-1, ФНО- α и sIgA определяли методом твердофазной ИФА в начале исследования и на 21 день.

Результаты. Показатели функционального состояния эпителия глазной поверхности представлены в таблице.

Динамика функциональных показателей, характеризующих выраженность ксеротических изменений эпителия глазной поверхности (n=20).

Как видно из таблицы, по результатам функциональных проб и биохимических исследований, к 7 сут. исследова-

ния развились стойкие ксеротические изменения эпителия глазной поверхности, усилившиеся к 21 сут. наблюдения, что достоверно подтверждает уровень в слезе провоспалительных цитокинов и sIgA.

Заключение: Полученные данные позволяют судить, что трансконъюнктивальные инъекции БТ-А в три основные слезные железы кролика ведут к значительному снижению слезопродукции и развитию выраженного ксероза эпителия глазной поверхности. Таким образом, данную методику можно использовать при моделировании ССГ на почве снижения слезопродукции.

РЕАКТИВНЫЕ МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ ИЗМЕНЕНИЯ И ИММУНОФЕНОТИПИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ЛИМФОЦИТОВ БРЫЖЕЕЧНЫХ ЛИМФАТИЧЕСКИХ УЗЛОВ ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ ЯЗВЕННОМ КОЛИТЕ

Постовалова Е.А., Макарова О.В.

ФГБНУ «НИИ морфологии человека», Москва, Россия
МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

Язвенный колит - многофакторное хроническое рецидивирующее воспалительное заболевание толстой кишки, в развитии которого играют роль генотип, особенности питания, стрессы и др. [Ткачев А.В., 2012]. Хронический воспалительный процесс при язвенном колите обусловлен нарушениями иммунологического и слизистого барьеров, которые в норме обеспечивают гомеостатическое взаимодействие макроорганизма с микрофлорой и препятствуют её транслокации из просвета толстой кишки [Kim Y.S., Ho S.B., 2010]. По данным литературы нарушения локальной иммунной системы характеризуются изменением баланса продукции про- и противовоспалительных цитокинов, а также соотношения Т-эффекторных и Т-регуляторных лимфоцитов [Powrie F., 2004]. При воспалительном процессе в любом органе и ткани развиваются структурно-функциональные изменения Т и В-зон лимфатических узлов, что является защитной реакцией, препятствующей генерализации инфекции.

Однако работы, которые посвящены изучению морфологических изменений брыжеечных лимфатических узлов, в литературе отсутствуют. При остром язвенном колите у мышей среди лимфоцитов брыжеечных лимфатических узлов Nakansson A. с соавт. (2014) выявили

ТАБЛИЦА. ДИНАМИКА ФУНКЦИОНАЛЬНЫХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ, ХАРАКТЕРИЗУЮЩИХ ВЫРАЖЕННОСТЬ КСЕРОТИЧЕСКИХ ИЗМЕНЕНИЙ ЭПИТЕЛИЯ ГЛАЗНОЙ ПОВЕРХНОСТИ (N=20) (К ТЕЗИСАМ ПОПОВА В.Ю. И ДР.)

Оцениваемый параметр	Этапы наблюдения (сутки)					
	Исходные данные	1	3	7	14	21
Стабильность прероговичной слезной пленки, с.	11.6±2.4	10.9±3.1	10.1±1.4	6.2±2.0	2.2±1.1	1.5±0.4
Суммарная слезопродукция, мм/5 мин.	14.1±1.4	13.8±0.9	11.1±1.5	7.1±1.9	3.2±1.0	2.8±0.4
Оценка эпителия по шкале van Bijsterveld*, баллы	-	1.4±0.3	2.8±0.9	5.3±1.4	6.8±1.2	8.4±0.2
IL-1, пг/мл	27.11±1,58	-	-	-	-	58.38±1,04
ФНО- α , пг/мл	33.07±2,93	-	-	-	-	67.07±0,81
sIgA, пг/мл	308.69±1,85	-	-	-	-	361.69±1,85

* 0 - нет окрашивания; 1 - слабое; 2 - умеренно выраженное; 3 - диффузное окрашивание

статистически значимое увеличение количества CD4+ и CD8+ Т-лимфоцитов, CD4+CD25+CTLA-4+FOXP3+ регуляторных Т-лимфоцитов.

Цель исследования – изучение морфологических изменений брыжеечных лимфатических узлов и оценка содержания в них субпопуляций лимфоцитов у самцов мышей C57Bl/6 при остром и хроническом язвенном колите, индуцированном декстрансульфатом натрия.

Материалы и методы. Язвенный колит моделировали заменой питьевой воды на 1% водный раствор декстрансульфата натрия в течение 5 суток. Животные были выведены из эксперимента на 7-е (острый колит) и 28-е (хронический колит) сутки от начала потребления декстрансульфата натрия. Проведено морфологическое исследование брыжеечных лимфатических узлов. С помощью точной цитофлуориметрии среди клеток, выделенных из брыжеечных лимфатических узлов, определяли субпопуляционный состав лимфоцитов. Использовали анти-тела фирмы «eBioscience» – CD3+CD4+ (Т-хелперы), CD3+CD8+ (цитотоксические Т-лимфоциты), CD19 (В-лимфоциты), CD4+CD25+FOXP3+ (регуляторные Т-лимфоциты).

При экспериментальном остром и хроническом колите в брыжеечных лимфатических узлах развиваются реактивные изменения по смешанному типу, характеризующиеся фолликулярной гиперплазией и синусной реакцией. При остром колите в брыжеечных лимфатических узлах расширяется корковый слой, светлые центры лимфоидных узелков, просветы синусов с увеличением в них лимфоцитов и макрофагов. При хроническом колите в отличие от острого в светлых центрах лимфоидных узелков много гибнущих клеток, а синусные реакции резко выражены.

При остром язвенном колите в брыжеечных лимфатических узлах снижается содержания CD19+ В-лимфоцитов и увеличивается – CD3+CD8+ цитотоксических Т-лимфоцитов, что, по-видимому, отражает процессы активации реакций Th1 типа. Увеличение содержания CD4+CD25+FOXP3+ регуляторных Т-лимфоцитов и CD3+CD8+ цитотоксических Т-лимфоцитов обусловлено усилением миграции лимфоцитов из тимуса и компартмента локальной иммунной системы ободочной кишки. При хроническом язвенном колите в брыжеечных лимфатических узлах увеличивается содержание CD19+ В-лимфоцитов и CD3+CD4+ Т-хелперов, что характерно для реакций адаптивного иммунитета и хронизации воспалительного процесса.

ОСОБЕННОСТИ ДИФФЕРЕНЦИРОВКИ СУБПОПУЛЯЦИЙ Т-ХЕЛПЕРОВ В ПАНКРЕАТИЧЕСКИХ ЛИМФАТИЧЕСКИХ УЗЛАХ В УСЛОВИЯХ СТРЕПТОЗОТОЦИНОВОГО ДИАБЕТА

Путилин Д.А., Камышный А.М.

Запорожский государственный медицинский университет, Запорожье, Украина

Введение: Важную роль в механизмах развития сахарного диабета (СД) играют изменения функционального состояния панкреатических лимфатических узлов (ПЛУ), дренирующих панкреатические островки, экзокринную часть поджелудочной железы, а также отдельные сегменты кишечника. В ПЛУ происходит начальная активация диабетогенных CD8 и CD4 Т-клеток до их миграции в панкреатические островки. Ключевыми регуляторами образования Th1-, Th2-, Th17-хелперов и Т-регуляторных (Treg) клеток являются транскрипци-

онные факторы T-bet, GATA-3, RORyt и Foxp3, уровень экспрессии которых определяет взаимную конкуренцию этих эффекторных субпопуляций Т-лимфоцитов.

Цель и задачи: Изучить особенности распределения T-bet+, GATA-3+, RORyt+ и Foxp3+-лимфоцитов в ПЛУ крыс в условиях экспериментального стрептозотоцинового диабета (ЭСД).

Материалы и методы: Исследования проводили на крысах линии Wistar. ЭСД моделировали путем в/брюшинного введения стрептозотоцина в дозе 50 мг/кг. Структуру популяции Th1-, Th2-, Th17-клеток и Treg изучали путем анализа гистологических срезов, окрашенных МКАТ соответственно к транскрипционным факторам T-bet, GATA-3, RORyt и Foxp3 (Santa Cruz Biotechnology) с помощью компьютерной программы ImageJ (NIH, США). Изображение, получаемое на микроскопе PrimoStar (ZEISS) в ультрафиолетовом спектре возбуждения 390 нм (FITC) с помощью камеры AxioCam 5c (ZEISS) и пакета программ AxioVision 4.7.2 вводилось в компьютер. Изучали лимфоциты в паракортикальной зоне и мягкотных тьяжах ПЛУ.

Результаты: Развитие ЭСД сопровождалось выраженным дисбалансом Т-хелперов в морфофункциональных зонах ПЛУ - наблюдалось увеличение общего количества Th1- и Th17-клеток на фоне снижения численности Treg и изменения концентрации транскрипционных факторов в лимфоцитах. Так, плотность популяции FoxP3+-лимфоцитов у экспериментальных животных с 3-х недельным ЭСД уменьшилась на 25% (p<0,05) в паракортикальной зоне и на 28% (p<0,05) в мягкотных тьяжах ПЛУ относительно контрольных значений.

Заключение: Выявленный дисбаланс субпопуляций эффекторных лимфоцитов в ПЛУ может являться одним из триггеров прогрессии сахарного диабета.

УЧАСТИЕ СЕМАФОРИНАЗА В ПРОЦЕССАХ АДГЕЗИИ ТИМОЦИТОВ К ЭПИТЕЛИАЛЬНЫМ КЛЕТКАМ ТИМУСА МЫШЕЙ

Рутто К.В.

ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины», Санкт-Петербург, Россия

Семафорин-3А (Sema 3A) относится к трансмембранным, секретрируемым гликопротеинам, которые отвечают за направление роста и отталкивание конусов аксонов. Кроме нейрональных функций известно так же, что Sema 3A синтезируется в тимусе, строме тимуса и в эпителиальных клетках тимуса человека [Y. Lepelletier, 2007], но исследования на тимусах мышей не проводились. Эпителий тимуса представляет собой важный компонент стромы и играет важную структурную и секреторную роль. Кортикальные эпителиальные клетки отвечают за положительную, а медуллярные – за отрицательную селекцию. Роль Sema 3A в тимусе мало изучена, предполагают, что Sema-3A участвует в механизмах адгезии тимоцитов и эпителиальных клеток [Y. Lepelletier, 2007; D.Mendes-da-Cruz, 2009; F.Garcia, 2012]. Целью нашей работы было изучение влияния Sema 3A на адгезию тимоцитов к монослою эпителиальных клеток тимуса мыши. Мы проводили работу на двух линиях кортикального cTEC1-2 и медуллярного mTEC3-10 эпителия тимуса мышей [M. Kasai et al., 1996]. Для определения синтез мРНК Sema 3A и его рецепторов, а именно PleA1-A4 и Nrp-1 в клетках эпителия и тимоцитах, мы использовали реакцию обратной транскрипции с последующей ПЦР со специфическими праймерами. Для оценки адгезии тимоцитов к монослою эпители-

альных клеток тимocyты окрашивали CFSE 2мкг/мл. Окрашенные клетки вносили в лунки с эпителиальными клетками. Клетки инкубировали 2 часа во влажной атмосфере 5% CO₂ при 37°C. Затем монослой отмывали 3 раза теплым раствором Хэнкса и лизировали при помощи 2М КОН. Интенсивность флюоресценции измеряли при Ex:485 нм и Em:538 нм. В предварительной части работы было установлено, что цельный тимус мышей, строма тимуса и тимocyты способны к синтезу мРНК Sema 3A. Так же было показано, что культивируемые кортикальные и медуллярные эпителиальные клетки тимуса мыши способны к экспрессии мРНК Sema 3A. Кроме того, мы охарактеризовали эпителиальные клетки по наличию рецепторов к Sema 3A. Так, было установлено, что клеточные линии тимусного эпителия экспрессируют Plex-A1, Plex-A3, NRP-1 и не экспрессируют Plex-A2 и Plex-A4 в пределах чувствительности данного метода. При исследовании наличия рецепторов к Sema 3A в изолированных тимocyтах, в целом были выявлены совпадения с эпителиальными клетками, за исключением того, что была выявлена экспрессия мРНК ещё одного трансмембранного рецептора Plex-A2. При изучении влияния Sema 3A на адгезию без предварительной преинкубации были получены данные, свидетельствующие о подавлении адгезии тимocyтов к монослою медуллярных эпителиальных клеток в диапазоне доз от 0,5 до 200 нг/мл, с максимумом при концентрации 100 нг/мл. Так как был получен эффект при совместной инкубации, нам необходимо было определить, на какие именно клетки подействовал семафорин, поскольку рецепторы для взаимодействия с ним располагаются как на тимocyтах, так и на эпителиальных клетках. В связи с этим мы проводили раздельную преинкубацию тимocyтов и эпителиальных клеток обеих линий с Sema 3A в течение 30 минут до постановки адгезии. При этом адгезия тимocyтов к медуллярным эпителиальным клеткам снижалась в диапазоне доз от 5 до 100 нг/мл. При преинкубации медуллярных эпителиальных клеток, адгезия тимocyтов также снижалась в диапазоне доз от 0,5 до 100 нг/мл. Таким образом, мы впервые показали, что кортикальные cTEC1-2 и медуллярные mTEC3-10 эпителиальные клетки тимуса мыши способны синтезировать мРНК Sema 3A и его рецепторы, а именно Plex-A1, Plex-A3, NRP-1. Было показано, что Sema 3A дозозависимо снижает адгезию тимocyтов к монослою медуллярных эпителиальных клеток тимуса мыши, как при совместной инкубации, так и при раздельной преинкубации тимocyтов и медуллярных эпителиальных клеток. Полученные нами данные подтверждают влияние Sema 3A на механизмы адгезии тимocyтов к эпителию и позволяют рассматривать эпителий и тимocyты в качестве возможных мишеней действия Sema 3A в организме

Работа поддержана грантом РФФИ № 15-04-06150.

ФИЗИОЛОГИЧЕСКИЙ РЕВМАТОИДНЫЙ ФАКТОР У МЫШЕЙ ПРИ ПСИХОФИЗИЧЕСКОМ СТРЕССЕ

Самигуллина Г.З., Абишева Н.Н., Богданова К.В., Сидоров А.Ю., Столярова Е.Ю.

ФГБОУ ВПО «Удмуртский государственный университет», Ижевск, Россия

Как известно, умеренные физические нагрузки обладают иммуностимулирующим эффектом и повышают функциональные возможности организма. Напротив, истощающие физические нагрузки часто приводят к развитию иммунодефицитов (Меерсон, 2002) и как следствие —

формированию феномена «открытого окна». Данный феномен можно представить в виде нарушения некоторых компонентов в иммунной системе, что может привести к повышению риска развития инфекций (Nieman 2008). Попытка обнаружить закономерную связь между наблюдаемыми изменениями в иммунной системе при интенсивных, длительных физических нагрузках и развитием иммунодефицитных состояний не привела к успеху.

В исследованиях на спортсменах высокого класса был выявлен феномен истощения иммуноглобулинов у спортсменов при физической нагрузке истощающего характера в период ответственных соревнований (Суздальницкий, Левандо, 2002). Однако механизм снижения иммуноглобулинов и биологическая целесообразность данного явления не ясны. Мы предполагаем, что иммуноглобулины при психофизическом стрессе подвергаются протеолизу с образованием Fc-фрагментов IgG, которые стимулирует пролиферацию регуляторной популяции ревматоидного фактора (РФ). В свою очередь РФ сдерживает развитие аутоиммунных реакций при психофизическом стрессе. Снижение иммуноглобулинов является «физиологической ценой» данного процесса. Основанием рассматривать РФ как фактор супрессорной регуляции, сдерживающий развитие аутоиммунных заболеваний, послужили результаты проведенных нами ранее исследований (Beduleva, Stolyarova, 2014). Целью работы было исследование уровня ревматоидного фактора у мышей при психофизическом стрессе.

Мышей (n=12) подвергали плаванию с грузом (10% от веса тела) до истощения, после кратковременного отдыха животные получали повторную физическую нагрузку. Нагрузки предъявлялась вторично после 2-х дневного перерыва. Контрольные животные (n=11) содержались в обычном режиме и физической нагрузке не подвергались. РФ определяли методом агглютинации таннизированных нагруженных гомологичным IgG эритроцитов, которая позволяет выявлять физиологическую популяцию ревматоидного фактора. Содержание IgG в плазме крови определяли методом РИД по Манчини.

В экспериментальной группе мышей выявлено достоверное снижение IgG плазмы крови после вторичного предъявления физической нагрузки. Достоверное повышение уровня РФ наблюдалось уже 4-ый день после начала эксперимента, т.е. происходило в ответ на первичную нагрузку. Вторичная нагрузка, вызвала дальнейшее повышение РФ. Уровень РФ оставался стабильно высоким в течение месяца. Таким образом, психофизический стресс (плавание до истощения) у мышей вызывает снижение уровня IgG плазмы крови и повышение в ней уровня ревматоидного фактора.

ХАРАКТЕРИСТИКА M2 МАКРОФАГОВ ЧЕЛОВЕКА ГЕНЕРИРОВАННЫХ В УСЛОВИЯХ ДЕФИЦИТА РОСТОВЫХ ФАКТОРОВ

Сахно Л.В., Шевела Е.Я., Тихонова М.А., Останин А.А.

ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии», Новосибирск, Россия

Макрофаги (Mф) играют важную роль в защите от патогенов, поддержании тканевого гомеостаза и процессах заживления. Выделяют как минимум два типа макрофагов с про- и противовоспалительной активностью, которые были обозначены, как M1- и M2-клетки, соответственно. M2 макрофаги играют важную роль в ограни-

чении воспалительного/иммунного ответа и стимуляции репаративных процессов. Традиционно иммуносупрессорную активность М2 связывают со сниженной продукцией провоспалительных и повышенным уровнем противовоспалительных цитокинов. В то же время учитывая принадлежность Мф к эффекторным клеткам нельзя исключать, что способность М2 подавлять Т-клеточный ответ может опосредоваться цитотоксической активностью Мф, обусловленной экспрессией на них проапоптогенных молекул. Целью работы явилось изучение продукции цитокинов и экспрессии про-апоптогенных и ингибиторных молекул (TRAIL, FasL, B7-H1, CD200R, CD206) в культурах М1 и М2 клеток. Кроме того, в работе было исследовано влияние нейтрализующих антител против TRAIL, CD206, FasL, B7-H1 на цитотоксическую и цитостатическую активность М2 макрофагов.

В работе исследованы фенотипические и функциональные свойства макрофагов, генерированных из моноцитов крови здоровых доноров в присутствии ГМ-КСФ в стандартных условиях (М1-клетки) и в условиях дефицита сывороточных/ростовых факторов (М2-клетки). Показано, что в отличие от М1-клеток популяция М2-подобных макрофагов характеризуется более низкой стимуляторной активностью в алло-СКЛ и повышенным содержанием CD206+клеток, а также клеток, экспрессирующих ко-ингибиторные (B7-H1) и проапоптогенные молекулы (FasL, TRAIL). Мультиплексный анализ 17 цитокинов показал, что М2-клетки характеризуются более низкой продукцией иммунорегуляторных, провоспалительных цитокинов и хемокинов (ИФН- γ , ИЛ-5, ИЛ-6, ФНО- α , ИЛ-17, MCP-1). При этом уровень иммуносупрессорных цитокинов был либо не изменен (ИЛ-10), либо также снижен (ИЛ-13). М2-макрофаги, генерируемые в условиях дефицита ростовых факторов, обладают повышенной цитотоксической и цитостатической активностью по сравнению с М1 клетками. Причем из 4-х анализируемых коингибиторных и проапоптогенных молекул (B7-H1, CD206, TRAIL, FasL) ведущую роль в реализации цитотоксического эффекта играет молекула B7-H1, нейтрализация которой снижает апоптоз-индуцирующую активность М2 клеток. В то же время блокирование CD206 и TRAIL оказывает умеренный, но значимый подавляющий эффект на цитостатическую активность М2 клеток. Таким образом, супрессорная активность М2 макрофагов, генерированных в условиях дефицита ростовых факторов, может быть обусловлена не только низкой продукцией макрофагами иммунорегуляторных и провоспалительных цитокинов, но и цитотоксическим/цитостатическим эффектом М2 клеток, опосредуемым через экспрессию молекул B7-H1, CD206 и TRAIL.

ЭКСПРЕССИЯ БЕЛКА OX40L ИЗ СЕМЕЙСТВА ФАКТОРА НЕКРОЗА ОПУХОЛЕЙ В КЛЕТКАХ МЛЕКОПИТАЮЩИХ

Серебровская Е.О.^{1,2}, Рюмина А.П.^{1,2}, Шаронов Г.В.³, Лукьянов С.А.^{1,2}

¹ ФГБУН Институт биоорганической химии им. академиком М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук, Москва, Россия

² ГБОУ ВПО НижГМА Минздрава России, Нижний Новгород, Россия

³ Московский Государственный Университет, Медицинский факультет, Москва, Россия

Рецептор OX40(CD134) и его лиганд OX40L(CD252), являются членами семейства фактора некроза опухолей и экспрессируются на активированных CD4- и CD8-

положительных Т-клетках, а также на многих других клетках лимфоидного и нелимфоидного происхождения. Костимулирующий сигнал OX40 стимулирует деление и способствует выживанию, улучшая клональную экспансию популяций эффекторов и клеток памяти в процессе их стимуляции антигеном. Кроме того, OX40 подавляет дифференцировку и активность регуляторных Т-клеток (Treg), еще более способствуя процессу клональной экспансии. Таким образом, стимуляция OX40 может быть перспективной стратегией для противораковой иммунизации.

С целью получения белка OX40L помощью лентивирусной трансдукции нами получены линии клеток С-26, стабильно коэкспрессирующих секретлируемый внеклеточный домен OX40L (OX40L_{exo}) мыши, секретлируемый внеклеточный домен OX40L в составе слитного белка с тримеризующим доменом коллагена мыши (OX40L_{tri}), а также полноразмерный OX40L, и EGFP. Исходя из предположения о том, что наличие флуоресценции в зеленом канале коррелирует с наличием экспрессии OX40L, была проведена сортировка клеток по яркости зеленой флуоресценции для выделения популяции клеток, экспрессирующих OX40L. Количество секретлируемого OX40L в среде после культивации клеток анализировали с помощью ELISA и составил $18 \pm 0,23$ нг/мл для OX40L_{exo}. Функциональную активность различных вариантов OX40L оценивали с помощью методики стимуляции периферических мононуклеарных клеток мыши (PBMC) *in vitro*. С помощью проточной цитофлуориметрии было показано, что OX40L_{exo} и OX40L_{tri} увеличивали выживаемость PBMC в культуре.

ДИНАМИКА ЗАЩИТНОГО ДЕЙСТВИЯ ЛИПОПОЛИСАХАРИДА ИЗ RHODOBACTER CAPSULATUS PG ОТ ТОКСИЧЕСКИХ ЭФФЕКТОВ ЭНДОТОКСИНОВ

Серов Д.А.¹, Кабанов Д.С.¹, Зубова С.В.¹, Косякова Н.И.², Прохоренко И.Р.¹

¹ ИФПБ РАН, Пущино, Московская обл., Россия

² Больница ПНЦ РАН, Московская обл., Россия

Поиск эффективных антагонистов эндотоксинов (липополисахаридов, ЛПС) является одной из актуальных задач современной биомедицины. Цель настоящей работы – исследование динамики антагонистического действия ЛПС из *Rhodobacter capsulatus* PG в подавлении синтеза клетками цельной крови человека провоспалительных раннего (TNF- α) и позднего (INF- γ) цитокинов, индуцированных эндотоксинами из *Escherichia coli* O55:B5 или *Salmonella enterica* серотип Typhimurium. Эксперименты были проведены на крови 6-ти условно здоровых доноров. Цельную кровь инкубировали с эндотоксинами (100 нг/мл) в течение 4, 6 и 24 ч. При исследовании защитных эффектов ЛПС из *R. capsulatus* (1000 нг/мл) пробы сначала инкубировали 30 мин с антагонистом после чего вносили эндотоксин из *E. coli* или *S. enterica* и инкубировали 4, 6 и 24 ч. Концентрации провоспалительных цитокинов определяли методом ELISA с использованием стандартных наборов по методике, рекомендованной производителем. Концентрацию TNF- α определяли через 4, 6 и 24 ч инкубации, а INF- γ через 24 ч. Результаты экспериментов приведены в таблице.

Из таблицы видно, что ЛПС из *R. capsulatus* не только не активизирует клетки цельной крови человека к продукции TNF- α и INF- γ , но более того проявляет антаго-

ТАБЛИЦА. КОНЦЕНТРАЦИИ (ПГ/МЛ) ПРОВОСПАЛИТЕЛЬНЫХ ЦИТОКИНОВ, СЕКРЕТИРОВАННЫХ КЛЕТКАМИ ЦЕЛЬНОЙ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА В РАЗНЫХ ВАРИАНТАХ ЭКСПЕРИМЕНТОВ (К ТЕЗИСАМ СЕРОВА Д.А. И ДР.)

Цитокин	Часы	Контроль	ЛПС _{R. caps}	ЛПС _{E. coli}	ЛПС _{R. caps} , ЛПС _{E. coli}	ЛПС _{S. enterica}	ЛПС _{R. caps} , ЛПС _{S. enterica}
TNF- α	4	3 \pm 1	12 \pm 5	548 \pm 66	163 \pm 36	547 \pm 94	97 \pm 40
	6	0	118 \pm 44	1206 \pm 250	403 \pm 145	1075 \pm 252	250 \pm 108
	24	6 \pm 3	10 \pm 4	349 \pm 104	42 \pm 13	242 \pm 46	22 \pm 12
INF- γ	24	1 \pm 1	18 \pm 12	369 \pm 67	60 \pm 23	331 \pm 65	35 \pm 16

нистическое действие, блокируя продукцию цитокинов, как более раннего TNF- α , так и более позднего INF- γ , индуцированных высокотоксичными ЛПС из *E. coli* или *S. enterica*. Усиление защитного эффекта против ЛПС *E. coli* и ЛПС *S. enterica* для данных цитокинов происходило примерно с равной скоростью.

Механизм антагонистического действия ЛПС из *R. capsulatus* – конкурентное связывание с рецепторами к ЛПС (TLR4/MD-2, CD14), блокирующее как ранний MyD88-зависимый сигнальный путь, активирующий синтез TNF- α клеткой в ответ на эндотоксины, так и поздний MyD88-независимый сигнальный путь, активирующий синтез INF- α , так и более позднего INF- γ , индуцированных высокотоксичными ЛПС из *E. coli* или *S. enterica*. Усиление защитного эффекта против ЛПС *E. coli* и ЛПС *S. enterica* для данных цитокинов происходило примерно с равной скоростью.

Механизм антагонистического действия ЛПС из *R. capsulatus* – конкурентное связывание с рецепторами к ЛПС (TLR4/MD-2, CD14), блокирующее как ранний MyD88-зависимый сигнальный путь, активирующий синтез TNF- α клеткой в ответ на эндотоксины, так и поздний MyD88-независимый сигнальный путь, активирующий синтез INF- γ .

РОЛЬ $\gamma\delta$ Т КЛЕТКИ В ПЕРЕКЛЮЧЕНИИ ИЗОТИПА ИММУНОГЛОБУЛИНОВ ПРИ ОТВЕТЕ НА Т-НЕЗАВИСИМЫЕ АНТИГЕНЫ 2-ГО ТИПА

Снегирева Н. А., Гаврилова М. В., Сидорова Е. В.

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

Введение: Гамма/дельта Т клетки ($\gamma\delta$ Т), как и В-1 лимфоциты (В-1), являются первыми лимфоидными клетками, появляющимися в онтогенезе. Значительная часть их локализуется в lamina propria и интраэпителиальном слое тонкого кишечника (IEL). От $\alpha\beta$ Т лимфоцитов $\gamma\delta$ Т отличаются способностью распознавать антигены (АГ), вне МНС II комплекса. О взаимодействии $\gamma\delta$ Т с другими клетками известно немного. Их функциональная роль в кишечнике неясна.

На долю слизистой оболочки кишечника приходится ~ 50% вырабатываемого мукозальной системой секреторного IgA. Примерно половину этих IgA продуцируют В-1 клетки lamina propria. Это свидетельствует о том, что в Т-независимых В-1 клетках кишечника идет переключение изотипа с IgM на IgA. Чем в отсутствие «стандартной» Т помощи обеспечивается это переключение и как оно осуществляется неясно. Предполагалось, что в переключении генов иммуноглобулинов (ИГ) в В-1 клетках кишечника участвуют $\gamma\delta$ Т, однако, прямой эксперимен-

тальной проверке это не подвергалось. Целью настоящей работы являлась проверка предположения об участии $\gamma\delta$ Т клеток в переключении изотипа Ig с IgM на IgA в В-1 клетках тонкого кишечника мыши. В задачи исследования входило: 1) разработка метода выделения $\gamma\delta$ Т клеток из кишечника мыши; 2) изучение in vitro иммунного ответа на Т-независимые АГ 2-го типа (ТН-2) при совместной инкубации В-1 лимфоцитов и $\gamma\delta$ Т; 3) изучение in vivo иммунного ответа на ТН-2 АГ у нормальных и нокаутных по гену δ мышей.

Материалы и методы: В опытах использовали мышей линий СВА и С57BL/6. В-1 клетки выделяли из перитонеальной полости; $\gamma\delta$ Т - из IEL тонкого кишечника мышей СВА. Чистоту выделенных клеток определяли цитометрически. В качестве АГ использовали альфа(1 \rightarrow 3) Декстран (Декс). АТ- и ИГ-продуценты (АОК и ИГОК, соответственно), выявляли методом ELISPOT.

Результаты и обсуждение. Выделение В-1 клеток представляет рутинную процедуру. Эффективного метода выделения $\gamma\delta$ Т из кишечника мышей (в отличие от выделения их из кишечника человека) в литературе описано не было. Это потребовало разработки такого метода. Получение IEL без переваривания ткани коллагеназой (стандартный подход) и очистка клеток с помощью TCR $\gamma\delta$ Т cell Isolation Kit (Miltenyi Biotec) позволила выделить $\gamma\delta$ Т с чистотой 92% в количествах, достаточных для проведения опытов in vitro.

Т и В-1 клетки (1:10 – 2:10) культивировали в присутствии и в отсутствие АГ и на 4-е сутки определяли количества IgM- и IgA- АОК и ИГОК. В культурах В-1 клеток выявлялись значительные количества ИГОК; преобладали IgM-ИГОК. АОК были представлены только IgM-клетками. Внесение АГ в культуру В-1 клеток приводило к незначительному увеличению числа IgM-ИГОК и АОК. Образования IgA-АОК или повышения числа IgA-ИГОК под влиянием АГ не наблюдалось. Увеличение содержания $\gamma\delta$ Т в культуре усиливало IgM-ответ на АГ, но не приводило к увеличению IgA-ответа, т.е. не способствовало переключению синтеза с IgM на IgA.

Для определения роли $\gamma\delta$ Т в образовании IgM- и IgA-АОК и ИГОК in vivo нормальным и нокаутным С57BL/6 мышам вводили Декс и на 4-е сутки определяли количества IgM- и IgA- АОК и ИГОК в селезенке. Специфический иммунный ответ на Декс и у нормальных и у нокаутных мышей отсутствовал. В тотальных ИГОК у нормальных мышей С57BL/6 преобладали IgA-, а у нокаутных - IgM-продуценты. Введение АГ приводило к сходному увеличению числа тотальных IgM и IgA-продуцентов у мышей обеих групп. Это указывает на то, что отсутствие в организме $\gamma\delta$ Т клеток не влияет на количество и соотношение IgM- и IgA-ИГОК в присутствии Декс.

Заключение: 1) Разработан метод выделения $\gamma\delta$ Т лимфоцитов из тонкого кишечника мыши. 2) В опытах *in vitro* впервые прямо показано, что $\gamma\delta$ Т лимфоциты не влияют на специфический и поликлональный иммунный ответ на ТН-2 АГ и на переключение изотипа ИГ в В-1 клетках. 3) Установлено, что отсутствие у мышей $\gamma\delta$ Т не влияет на образование IgM- и IgA-продуцентов в присутствии Декс в селезенке животных.

ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ ФАКТОРА ИНГИБИРУЮЩЕГО МИГРАЦИЮ МАКРОФАГОВ С ЦЕРУЛОПЛАЗМИНОМ ЗАВИСИТ ОТ ЛАБИЛЬНЫХ ИОНОВ МЕДИ И ПОТЕНЦИРУЕТ СЕПТИЧЕСКИЙ ШОК У МЫШЕЙ

Соколов А.В., Костевич В.А., Грудинина Н.А., Захарова Е.Т. Васильев В.Б.

ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины», Санкт-Петербург, Россия

Провоспалительный цитокин, фактор ингибирующий миграцию макрофагов (MIF), является мишенью для фармакологической коррекции сепсиса и канцерогенеза и обладает ферментативными активностями таутомеразы и тиолоксидоредуктазы. Показано, что антитела, блокирующие MIF, препятствовали летальному эффекту при модели септического шока, а мыши, нокаутированные по гену MIF устойчивы к летальным дозам липополисахарида (LPS). Несмотря на многолетние исследования MIF в настоящее время в литературе дебатруется вопрос о физиологической субстрате его ферментативных активностей. Показано, что сайт-направленный мутагенез MIF по аминокислотному остатку P1, который необходим для катализа изомеризации гидроксифенилпирувата (HPP), препятствует связыванию MIF с его клеточным рецептором CD74 и проведению провоспалительного сигнала. Таким образом, изучение модуляции таутомеразной активности MIF перспективно для коррекции его участия в воспалительных реакциях. При протеомном анализе мочи больных с инфекциями мочеполового тракта был обнаружен комплекс MIF с церулоплазмином (CP). Однако функциональная характеристика этого взаимодействия не была проведена. Впервые показано ингибирование таутомеразной активности MIF в отношении HPP в присутствии CP. Необходимым элементом для ингибирования активности MIF является связывание лабильных ионов меди с CP (CP+Cu(II)). Помимо 6 ионов меди прочно связанных с полипептидной цепью CP известно наличие в молекуле белка, по крайней мере, трех сайтов для связывания лабильных ионов меди. Два сайта были выявлены при кристаллографическом исследовании CP при насыщении кристаллов неорганическими солями меди (II), кобальта (II). Нами было показано, что в лабильные сайты можно встроить ионы никеля (II). Конформация остатков E971, D684 и H602 (4 домена) и E935, D1025 и H940 (6 доменов) различаются в структуре CP со свободными сайтами и занятыми ионами Ni (II). Так называемый прооксидантный ион меди был выявлен при изучении окисления липопротеинов низкой плотности CP. Этот ион связан с остатком H426 и не связывается с ним после обработки белка диэтилпиноксикарбаматом (DEPC). Показано, что CP+Cu(II) является бесконкурентным ингибитором MIF ($K_i \sim 37$ нМ). Аргументом в пользу участия ионных сил при формировании комплекса MIF-HPP-CP+Cu(II) является снижение ингибирующего эффекта CP+Cu(II) при повышении

концентрации боратного буфера в среде. Ингибирующий эффект CP+Cu(II) не зависел от степени ограниченного протеолиза белка. Фильтрация CP+Cu(II) через колонку с Chelex-100 либо присутствие высоких концентраций гистидина, цистеина либо метионина лишали CP ингибирующего эффекта. Модификация остатков гистидина в CP с помощью DEPC не повлияла на его способность ингибировать MIF в присутствии меди. Добавление солей Co (II) и Ni (II), замещающих ионы меди в лабильных сайтах, препятствовало ингибирующему эффекту CP+Cu(II). Ковалентная модификация активного центра MIF фенолметилсульфонилфторидом (PMSF) приводила к сорбции MIF-PMSF на CP иммобилизованном на чипе CM5 с константой диссоциации 4,2 мкМ. При введении D-галактозамин-сенситизированным мышам 5 мг CP+Cu(II) смертность от введения 200 нг LPS увеличилась с 54 до 100%, при этом 5 мг аффинных антител против MIF препятствовали летальному эффекту. Вероятно, лабильные ионы меди в CP могут потенцировать *in vivo* провоспалительный сигнал MIF. Исследование поддержано грантом РФФИ № 13-04-01186. Авторы выражают благодарность О.Ю. Третьякову за любезно предоставленную плазмиду ptt100, содержащую последовательность ДНК, соответствующую полноразмерному гену MIF человека.

ВЛИЯНИЕ ЦИТОКИНОВ, ИМЕЮЩИХ ОБЩУЮ -ЦЕПЬ РЕЦЕПТОРОВ (IL-2, IL-7 И IL-15) НА ДИФФЕРЕНЦИРОВКУ ЦИТОТОКСИЧЕСКИХ -CD8+CD45RO+ Т-ЛИМФОЦИТОВ ПАМЯТИ IN VITRO

Сохоневич Н.А., Юрова К.А., Хазиахматова О.Г., Литвинова Л.С.

Балтийский федеральный университет имени Иммануила Канта, Калининград, Россия

Введение. Антиген-независимая активация CD8+ Т-клеток сопровождается усилением их способности к продукции эффекторных цитокинов и повышает цитолитическую активность этих лимфоцитов в отношении клеток-мишеней. Предполагают, что созревание и дифференцировка цитотоксических CD8+ Т-клеток, индуцируемые цитокинами, могут внести значительный вклад в активацию системы приобретенного или специфического иммунитета и привести к случайной активации клонов аутореактивных CD8+ Т-клеток (Geginat J. et al., 2003; Ramanathan S. et al., 2009).

Цель. Оценить эффекты цитокинов, имеющих общую -цепь рецепторов (IL-2, IL-7 и IL-15) на дифференцировку и созревание CD8+CD45RO+ Т-клеток в условиях клеточного культивирования *in vitro*.

Материалы и методы. Материалом исследования служила венозная кровь 58 условно здоровых доноров (29 женщин и 29 мужчин, от 20 до 35 лет). Выделенные методом иммуномагнитной сепарации («MiltenyiBiotec», Germany) примированные (CD45RO+) Т-лимфоциты (1×10^6 кл/мл) инкубировали в бессывороточной среде Искова без/и в присутствии Т-клеточного активатора (T-Cell Activation/Expansion Kit human (Ac/Exp), Miltenyi Biotec, Германия) и разных концентраций рекомбинантных форм цитокинов (rIL-2, rIL-7 и rIL-15) (MiltenyiBiotec, Германия) в течение 48 часов при 37°C и 5% CO₂.

Для выполнения исследования были использованы следующие варианты культивирования:

1. для гомеостатической модели: интактная проба; пробы с добавлением разных концентраций цитокинов: rIL-2/rIL-7 или rIL-15 (0,1; 0,5 или 1,0 нг/мл);

2. для активационной модели: интактная проба; проба с добавлением Т-клеточного активатора - Ас/Ехр; пробы с добавлением разных концентраций цитокинов: rIL-2/rIL-7 или rIL-15 (0,1; 0,5 или 1,0 нг/мл) и Т-клеточного активатора.

Исследование количества Т-лимфоцитов, экспрессирующих молекулы - CD3, CD8, CD62L и CD27 в CD45RO+ - культурах, проводили методом проточной цитометрии с помощью МКАТ, меченных флуоресцентными метками: ViaBlue, FITC, PE, PEСy7, PerCP, соответственно («eBioscience», США) на приборе «MACSQuantAnalyzer» («MiltenyiBiotec», Германия). Результаты цитометрического анализа были проанализированы с помощью программы «KALUZA Analysis Software» (Beckman Coulter, США). Статистическая обработка результатов осуществлялась с помощью программы IBM SPSS Statistics 20 (Statistical Package for the Social Sciences).

Результаты. На момент окончания срока инкубации (48ч), число центральных Т-клеток памяти с фенотипом CD3+CD8+CD62L+CD27+ (TCM) в интактных популяциях CD45RO+ Т-клеток составило 21,19(20,76 – 27,24)%; незрелых эффекторных клеток CD3+CD8+CD62L-CD27+ (TEM: Em1; Em2) – 31,90 (28,51 – 42,48)%, а зрелых эффекторных CD3+CD8+CD62L-CD27- (TEM: Em3; Em4) - 37,90 (34,51 – 45,48)%. Также, в популяции CD8+CD45RO+ Т-клеток нами была обнаружена минорная популяция - CD3+CD8+CD62L+CD27- (предположительно – которая может рассматриваться в переходной форме между TCM и TEM, индуцируемая *in vitro*). Эффекты IL-2 и IL-15 (1,0 нг/мл) и IL-7 (0,1х нг/мл) *in vitro* на культуры CD45RO+ Т-клеток были ассоциированы с увеличением числа зрелых эффекторных цитотоксических (CD8+) Т-лимфоцитов с фенотипом - CD62L-CD27- (Tem: Em3 и Em4) за счет снижения содержания CD62L+CD27+ (TCM) и CD62L-CD27+ (TEM: Em1 и Em2) Т-клеток. Добавление Т-клеточного активатора в CD45RO+ Т-клеточные культуры приводило к росту содержания зрелых эффекторных Т-клеток (CD8+CD62L-CD27-) на фоне снижения числа CD62L+CD27+ (TCM) Т-клеток. Инкубация TCR-активированных CD8+CD45RO+ Т-клеток с rIL-2 и rIL-15 (во всем спектре действующих концентраций) а также с rIL-7 (1,0 нг/мл) приводила к дифференцировке и созреванию цитотоксических Т-лимфоцитов в эффекторные Т-клетки, что фенотипически выражалось повышением числа цитотоксических лимфоцитов с фенотипом CD62L-CD27- (TEM: Em3 и Em4) и CD62L-CD27+ (TEM: Em1 и Em2) на фоне снижения содержания CD62L+CD27+(TCM).

Выводы. Цитокины (rIL-2 , rIL-7 и rIL-15) в гомеостатической модели клеточного культивирования *in vitro* (без TCR-активации), способствуют образованию только зрелых эффекторных Т-лимфоцитов - CD8+CD62L-CD27- (TEM: Em3; Em4), за счет снижения содержания клеток центральной памяти CD62L+CD27+ (TCM) и незрелых эффекторов - CD62L-CD27+ (TEM: Em1 и Em2). На фоне TCR-активации, цитокины (rIL-2 , rIL-15 и rIL-7) способны индуцировать образование цитотоксических зрелых (TEM: Em3; Em4) и незрелых (TEM: Em1; Em1) эффекторных Т-клеток из центральных Т-клеток памяти (TCM).

Работа выполнена в рамках стипендии Президента РФ (СП-454.2013.4) и субсидии на выполнение государ-

ственной работы «Организация проведения научных исследований» (№603).

ВЛИЯНИЕ ИНГИБИТОРА PI3K НА КАРРАГИНАН-ИНДУЦИРОВАННОЕ ВОСПАЛЕНИЕ

Трофимова Е.С., Данилец М.Г., Лигачёва А.А., Шерстобоев Е.Ю., Дыгай А.М.

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение НИИ фармакологии и регенеративной медицины имени Е.Д. Гольдберга, Томск, Россия

Введение. Семейство ферментов фосфатидилинозитол-3-киназ (PI3K), фосфорилирующих фосфатидилинозитол в положении 3D инозитольного кольца, являются важнейшими сигнальными молекулами, участвующими в таких процессах, как апоптоз, пролиферация, обмен веществ и дифференцировка клеток [Engelman J. A. et al., 2006]. Нарушения сигнального пути PI3K/Akt выявлены при патогенезе иммунных и онкологических заболеваний, сахарного диабета [Drees V. E. M. G. V. et al., 2006]. Выявлено, что киназа Akt, связываясь с киназой ингибитора нуклеофильного фактора κB (NF- κB), приводит к его активации [Sun Z.J. et al., 2010]. Одной из функций NF- κB является регуляция продукции провоспалительных факторов – ФНО- α , ИЛ-1 β , -6, -12, ЦОГ-2, индуцибельной NO-синтазы, ростовых факторов, ферментов, молекул клеточной адгезии и др. [Hayden M.S., Ghosh S., 2004]. Известно, что ингибитор сигнального пути PI3K LY294002 [Walker E.H. et al., 2000] также снижает опосредованно ДНК-связывающую активность NF- κB и NF- κB -зависимую экспрессию репортёрных генов [Kim Y. H. et al., 2005]. Коррекция активности NF- κB достаточно давно является эффективным подходом для поиска селективных фармакологических веществ направленного действия и новых мишеней для противовоспалительной терапии [Bonizzi G., Karin M., 2004].

Цель: изучение влияния синтетического ингибитора PI3K LY294002 (2-(4-морфолинил)-8-фенил-4Н-1-бензопиран-4-ОН), являющегося производным флавоноидов кверцетина, на локальное воспаление, индуцированное каррагинаном.

Задачи: выбрать концентрации исследуемых веществ, не вызывающие воспалительной реакции; оценить их влияние *in vivo* на каррагинановый отёк и цитотоксическое действие *in vitro*.

Материал и методы: Каррагинан-индуцированный отёк моделировали введением под апоневротическую пластинку задней (опытной) лапы мышей линии C57BL/6 1% раствора каррагинана (тип 1, «Sigma», США). Препарат сравнения (вольгарен («Новартис Фарма АГ», Швейцария)) или LY294002 («InvivoGen», США) вводили в обе лапы. Местную воспалительную реакцию оценивали через 4 часа по разнице массы опытной и контрольной лап и выражали в мг. Цитотоксическое действие изучаемых веществ оценивали колориметрическим методом [Mosmann T., 1983] по пролиферации перитонеальных макрофагов (2,6 млн/мл) *in vitro* (37°C, 5% CO₂ и 100% влажность), внося раствор МТТ (2 мг/мл; «Sigma», США). Абсорбцию растворов, полученных при добавлении через 4 ч к осадку диметилсульфоксида («Татхимфармпрепараты», Россия), измеряли при помощи спектрофотометра Titertek Multiskan® MCC («Labsystems», Финляндия) при длине волны 540 нм. Статистическую обработку проводили с помощью программы Statistica 6.0, используя одно-

факторный дисперсионный анализ и t-критерий Даннета ($p < 0,05$).

Результаты: Концентрации веществ, не вызывающие воспалительной реакции, были подобраны в предварительных экспериментах. При изучении влияния исследуемых веществ на протекание каррагинан-индуцированного отёка выявлено, что введение вольгарена (10^{-3} М) привело к снижению величины реакции в 3,2 раза. Ингибитор Р13К подавлял воспаление во всех изученных концентрациях, уменьшая отёк в 2,9 раза в концентрации 10^{-6} М, в 2,2 раза — 10^{-5} М и в 2,5 раза — 10^{-4} М, что сравнимо с противовоспалительным действием вольгарена. Однако при изучении влияния исследуемых веществ *in vitro* на макрофаги обнаружено, что инкубация клеток с вольгареном и LY294002 в концентрации 10^{-4} М привела к значительному угнетению их пролиферации в 2,5 и 2 раза, соответственно.

Заключение: Ингибитор сигнального пути Р13К LY294002 оказывает противовоспалительное действие, снижая локальное воспаление, вызванное каррагинаном. При этом в низких концентрациях (10^{-5} и 10^{-6} М) ингибитор не проявляет цитотоксического действия в отличие от вольгарена. Таким образом, LY294002 представляет собой перспективную субстанцию для разработки фармакологических веществ, корректирующих молекулярные механизмы воспаления.

МОРФОФУНКЦИОНАЛЬНОЕ СОСТОЯНИЕ КЛЕТОК СИСТЕМЫ МОНОНУКЛЕАРНЫХ ФАГОЦИТОВ НА ФОНЕ РЕПАРАТИВНОЙ РЕГЕНЕРАЦИИ ЩИТОВИДНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

Улитко М.В.

Уральский федеральный университет имени первого Президента России Б.Н. Ельцина, Екатеринбург, Россия

Введение. Одним из важных компонентов иммунной системы являются клетки системы мононуклеарных фагоцитов, участвующие в противоинфекционной защите, в восстановлении нарушенных функций организма, контролирующей рост и регенерацию тканей. Макрофаги костного мозга, располагаясь в центре эритробластического островка, стимулируют регенераторные процессы в кроветворной ткани, регулируют пролиферацию и дифференцировку эритроидных клеток в физиологических условиях и при патологии.

Цель работы: изучить морфофункциональное состояние клеток системы мононуклеарных фагоцитов у крыс после резекции щитовидной железы.

Материалы и методы. Эксперименты выполнены на самцах белых беспородных крысах массой 180-200 г. Исследования проводили на 1-е, 7-е и 14-е сутки после субтотальной резекции обеих долей щитовидной желе-

зы. Морфофункциональное состояние клеток системы мононуклеарных фагоцитов оценивали по активности моноцитопоза, ферментативной и гемопоэтической активности макрофагов костного мозга. Активность моноцитопоза определяли путем подсчета клеток моноцитарного ряда в миелограмме, ферментативную активность — по степени активности неспецифической эстеразы после цитохимической окраски мазков костного мозга по методике G.Gomori, гемопоэтическую — на основе количественного и качественного анализа эритробластических островков (ЭО) костного мозга (Ю.М. Захаров, 2001).

Результаты и обсуждение. Результаты исследования приведены в таблице.

Резекция щитовидной железы приводит к усилению пролиферативной активности моноцитов и миграции их в периферическую кровь. Активация моноцитопоза сопровождается повышением функциональной активности моноцитов костного мозга на ранних сроках регенерации щитовидной железы. Увеличение этих показателей в сроки наибольшей активности восстановительных процессов щитовидной железы, возможно связано с участием макрофагов в репаративной регенерации органа. Одним из механизмов активации может быть влияние тиреотропного гормона, количество которого увеличивается после резекции щитовидной железы. Воздействие активирует гемопоэтическую функцию макрофагов костного мозга, что проявляется в ускорении созревания эритроидных клеток в эритробластических островках и усилении повторного вовлечения макрофагов в эритропоэз. В периферической крови повышается относительное количество ретикулоцитов (с $2,16 \pm 0,22\%$ до $11,92 \pm 0,27\%$) при снижении общего числа эритроцитов на 7-е сутки.

Заключение. Морфофункциональные изменения клеток системы мононуклеарных фагоцитов на разные сроки после резекции щитовидной железы проявляются увеличением их пролиферативной, ферментативной и гемопоэтической активности и свидетельствуют о системном характере реакции моноцитов на экстремальный фактор.

ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ БЕЛКА КОМПЛЕМЕНТА C1q С АНТИМИКРОБНЫМИ ПЕПТИДАМИ

Умнякова Е.С., Берлов М.Н., Леонова Т.С.,
Модлая А.Е., Кокряков В.Н.

ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины», Санкт-Петербург; Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург

Антимикробные пептиды (АМП) млекопитающих являются неотъемлемыми гуморальными факторами врожденного иммунитета. В настоящее время АМП рас-

ТАБЛИЦА. ВЛИЯНИЕ ИНГИБИТОРА LY294002 И ВОЛЬГАРЕНА НА КАРРАГИНАН-ИНДУЦИРОВАННЫЙ ОТЁК ($\bar{x} \pm m$) (К ТЕЗИСАМ ТРОФИМОВОЙ Е.С. И ДР.)

Исследуемое вещество, М	Величина реакции, мг	Пролиферация (оптическая плотность)
Контроль	–	61,6 \pm 3,0
Вольгарен	10^{-3}	403 \pm 12
Ингибитор Р13К	10^{-6}	19,0 \pm 1,8*
	10^{-5}	21,2 \pm 1,9*
	10^{-4}	27,8 \pm 4,8*
		24,2 \pm 5,9*
		375 \pm 19
		378 \pm 19
		199 \pm 11*

Примечание: * — различие показателя с контролем достоверно, $p < 0,05$; $n = 5$

смаатриваются не только как эффекторные, но и как регуляторные молекулы, обладающие разнообразными иммуномодуляторными свойствами. В частности, описано их влияние на активность комплемента, которое возможно за счет взаимодействия АМП с рецепторными молекулами системы комплемента (C1q, MBL). Данные о такого рода взаимодействиях остаются многочисленными и, отчасти, противоречивыми. В настоящее время существует множество патологических состояний, связанных либо с гипо-, либо с гипер-активацией каскада комплемента. Поэтому поиск соединений, способной регулировать активность комплемента, является актуальной задачей. Целью данной работы стало изучение белок-белковых взаимодействий C1q с рядом АМП. Были исследованы представители основных групп АМП человека – α -дефенсинов (HNP-1), β -дефенсинов (HBD-2) и кателицидинов (LL-37). Также был исследован протегрин-1 свиньи (PG-1). Будучи кателицидином, он имеет сходные черты строения с дефенсинами.

Для оценки способности C1q взаимодействовать с антимикробными пептидами использовали иммуоферментный и рецепторно-ферментный анализы. Для выявления комплексов, которые образуют молекулы АМП и C1q в лунках планшета, использовали поликлональные антитела к С субъединице C1q и конъюгат C1q с пероксидазой хрена соответственно.

С помощью рецепторно-ферментного анализа мы впервые показали взаимодействие PG-1 с C1q и установили, что LL-37 с этим белком не взаимодействует. Также подтвердили литературные данные о взаимодействии HNP-1 и HBD-2 с C1q. Комплексы пептидов с C1q не разобшались в присутствии 0,5 М NaCl.

С помощью иммуоферментного анализа выявляется только комплекс пептида PG-1 с C1q. Он стабилен и в присутствии 0,5 М NaCl. Отсюда мы предполагаем, что ключевую роль в образовании комплексов HNP-1 и HBD-2 с C1q человека играет субъединица С последнего или общие для разных субъединиц антигенные детерминанты, т.к. такие комплексы могут разобшаться в присутствии используемых антител. Это может быть связано с тем, что взаимодействие C1q с PG-1 происходит без участия субъединицы С или связывание C1q с PG-1 столь высокоаффинно, что антитела не разобшают этот комплекс.

Такого рода взаимодействия между молекулами АМП и C1q, являющимися важнейшими факторами врожденного иммунитета, могут быть существенны для регуляции активности каскада комплемента.

МЕТАБОЛИЧЕСКИЕ ФУНКЦИИ ЛЕГКИХ ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ АУТОИММУННОМ ЭНЦЕФАЛОМИЕЛИТЕ

Уракова М.А., Брындина И.Г.

«Ижевская государственная медицинская академия»
МЗ РФ, Ижевск, Россия

На сегодняшний день известно, что легкие наряду с участием в газообмене, выполняют целый ряд нереспираторных функций, в том числе связанных с метаболизмом большого количества веществ (Лысенков С.П., Тель Л.З., 2014). Особенно высока интенсивность в легочной ткани фосфолипидного обмена. Являясь основной частью сурфактанта, альвеолярные фосфолипиды обеспечивают его наиболее значимую функцию - поддержание поверхностного натяжения в альвеолах (Ерохин В.В., Л.К. Романова, 2000). Наряду с этим, установлено изменение обмена липидов при аутоиммунной патологии ЦНС - рассеянном склерозе (Del Voggio P. et al., 2011). Для изучения особенностей этиологии и патогенеза рассеянного склероза в фундаментальных исследованиях используют модель экспериментального аутоиммунного энцефаломиелита (ЭАЭ).

Целью работы явилось исследование метаболических функций легких при экспериментальном аутоиммунном энцефаломиелите. В связи с целью определены следующие задачи: 1) изучить поверхностно-активные свойства и состав фосфолипидов сурфактанта легких при ЭАЭ; 2) исследовать изменения фракционного состава фосфолипидов притекающей и оттекающей от легких крови при ЭАЭ; 3) выявить взаимосвязь между изменением фосфолипидов сурфактанта легких и крови при ЭАЭ.

Опыты выполнены на 40 крысах-самцах массой 180-250 г. ЭАЭ моделировали на 15 животных путем подкожной инокуляции энцефалитогенной смеси с полным адьювантом Фрейнда (Li Z. et al., 2012). В качестве контроля использовалось 25 интактных животных. Спустя 3 недели у всех крыс путем трехкратного лаважа 0,9% раствором

ТАБЛИЦА (К ТЕЗИСАМ УЛИТКО М.В.)

Показатели морфофункционального состояния моноцитов/макрофагов	Интактные животные	Животные после резекции щитовидной железы		
		1-е сутки	7-е сутки	14-е сутки
Количество моноцитов костного мозга, млн./100 г массы	0,93±0,08	5,82±0,22*	4,63±0,23*	6,95±0,22*
Количество моноцитов периферической крови, Г/л	0,28±0,03	0,50±0,04*	0,45±0,02*	0,44±0,01*
Индекс активности неспецифической эстеразы, усл.ед.	1,25±0,004	1,91±0,01*	2,07±0,06*	1,28±0,02
Количество макрофагов костного мозга, образующих ЭО, %	4,79±0,06	1,49±0,05*	1,33±0,03*	4,05±0,05
Повторное вовлечение макрофагов в эритропоз, отн. ед.	0,33±0,03	0,40±0,02	0,60±0,04*	0,98±0,08*
Длительность созревания ЭО, отн. ед.	1,94±0,14	1,63±0,12*	1,47±0,13*	2,04±0,17

* - достоверные различия от интактных животных

NaCl получали бронхо - альвеолярные смывы (БАС), где определяли содержание общих фосфолипидов (Комаров Ф.И., 1981). В эти же сроки у животных забирали артериальную и венозную кровь из левого и правого желудочка сердца соответственно. С помощью тонкослойной хроматографии определяли фосфолипидный спектр артериальной (арт) и венозной (вен) крови, легочного сурфактанта - фосфатидилхолин (ФХ), лизофосфатидилхолин (ЛФХ), сфингомиелин, фосфатидилэтанолламин (ФЭА), фосфатидная кислота (ФК), фосфатидилсерин, фосфатидилинозитол (Кондрахин И.П., 2004). Поверхностно-активные свойства легких определяли путем измерения статического, минимального, максимального поверхностного натяжения (ПН) БАС.

В ходе проведенных исследований было выявлено, что моделирование ЭАЭ приводило к снижению общего количества фосфолипидов легких до $28,17 \pm 2,50$ мкмоль/г против $49,50 \pm 5,72$ мкмоль/г в контроле ($p < 0,05$). При этом наблюдалось увеличение содержания ЛФХ на 115 % и снижение ФХ и ФЭА на 57 % и 42 % соответственно по сравнению с интактными животными ($p < 0,05$). Наряду с этим, нейродегенеративная патология сопровождалась увеличением статического ПН на 14 %, минимального ПН – на 24 %, максимального ПН – на 10% по сравнению с контролем ($p < 0,05$). По-видимому, уменьшение общих фосфолипидов сурфактанта и ухудшение его поверхностной активности было вызвано снижением содержания ФХ - основной поверхностно-активной фракции, составляющей более 50% от всего количества альвеолярных фосфолипидов. Наряду с этим, нельзя исключить влияния на стабильность мономолекулярного слоя сурфактанта ЛФХ, обладающего детергентным действием на фосфолипидные мембраны (Мотавкин П.А., Гельцер Б.И., 1998). Изучение фракционного состава фосфолипидов венозной и артериальной крови у крыс с ЭАЭ выявило однонаправленность изменений, характеризующуюся увеличением ЛФХ на 178% и 109% и снижением количества ФХ на 18% и 24% соответственно ($p < 0,05$). При оценке метаболической функции легких было выявлено, что ФКарт/ФКвен возрастали на 166%, а ФЭАарт/ФЭАвен - на 222% ($p < 0,05$). Общеизвестно, что легкие извлекают липиды из притекающей венозной крови для синтеза сурфактанта. Наши данные позволяют предположить, что экспериментальный аутоиммунный энцефаломиелит сопровождается значительным снижением использования ФК и ФЭА для образования альвеолярных фосфолипидов.

Таким образом, экспериментальный аутоиммунный энцефаломиелит сопровождается изменениями метаболических функций легких, проявляющимися изменением фосфолипидного спектра крови и бронхо-альвеолярных смывов, что приводит к нарушению функциональных возможностей сурфактанта легких.

ИЗМЕНЕНИЕ ФЕНОТИПА ЛИМФОЦИТОВ ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ГИПЕРГОМОЦИСТЕИНЕМИИ

Фефелова Е.В., Терешков П.П., Измestьев С.В., Дутов А.А., Цыбиков Н.Н.

ГБОУ ВПО ЧГМА, Чита, Россия

Обнаружено, что мишенью действия гомоцистеина (ГЦ) в мозге могут быть глутаматные рецепторы, в частности, NMDA-рецепторы, присутствующие не только в нервной ткани, но и в некоторых клетках иммунной

системы, в частности, в лимфоцитах, что делает их потенциальной мишенью для ГЦ в условиях повышения его концентрации. Целью нашей работы явилось изучение влияния гипергомоцистеинемии на изменение фенотипа лимфоцитов крыс.

Материалы и методы. В эксперименте включены 30 белых беспородных крыс, возраст которых на начало эксперимента составил 1 месяц. Были сформированы группы: контрольная и две опытных по 10 животных в каждой. Животным контрольной группы вводили 0,9% раствор NaCl, 1-ой опытной – раствор ГЦ, 2-ой опытной – ГЦ-тиолактон в течение 30 дней. Доза ГЦ и ГЦ-тиолактона составила 100 мкмоль на 1 грамм массы тела. Уровень ГЦ в сыворотке крови определяли методом ВЭЖХ. Субпопуляции лимфоцитов определяли методом проточной цитофлюориметрии на аппарате FC (BC) 500. Статистический анализ полученных данных проводили с помощью непараметрических методов, критический уровень значимости при проверке статистических гипотез принимали $p < 0,05$.

Результаты и их обсуждение. У 45% 1-ой опытной группе наблюдалось повышение концентрации ГЦ в сыворотке крови ($14,51 [13,66; 19,32]$ мкмоль/л против $7,99 [6,73; 10,67]$ мкмоль/л у контрольной группы), а у 55% – достоверное его снижение ($3,89 [2,57; 4,86]$ мкмоль/л). Введение ГЦ-тиолактона привело к снижению общего уровня ГЦ ($4,18 [3,175; 5,86]$ мкмоль/л). Колебания количества лимфоцитов во всех исследуемых группах не наблюдалось. При этом зафиксирован рост числа Т- (CD3+) и В-лимфоцитов (CD3-, CD45RA+) в группе с ГЦ, снижение в 2 раза числа Т-хелперов (CD3+, CD4+) во 2-ой и 1-ой опытной группе со сниженным уровнем ГЦ. В этих же группах зафиксировано и уменьшение цитотоксических Т-лимфоцитов (CD3+, CD8+). Значимых различий в содержании натуральных киллеров не зафиксировано (CD3-, CD161aх+). Таким образом, у большинства животных резервные возможности организма оказались высокими, о чем свидетельствует снижение концентрации гомоцистеина сыворотки крови, у второй части получен срыв механизмов адаптации. Данные результаты можно объяснить только тем, что в эксперимент были включены нелинейные животные, обладающие разными компенсаторными возможностями.

Выводы. На фоне экзогенной ГЦЦ наблюдается изменение фенотипа лимфоцитов, что требует дальнейшего изучения механизмов этого явления.

ВЛИЯНИЕ ТУЧНЫХ КЛЕТОК НА РЕПАРАТИВНЫЕ ПРОЦЕССЫ В ТКАНЯХ С РАЗНОЙ СТЕПЕНЬЮ ИММУНОПРИВИЛЕГИРОВАННОСТИ

Храмцова Ю.С., Арташян О.С., Волкова Ю.Л., Незговорова Н.Ю.

Институт иммунологии и физиологии УрО РАН, УрФУ, Екатеринбург, Россия

В настоящее время показано, что на повреждение различных органов тучные клетки реагируют сложнейшей внутренней морфофункциональной перестройкой, оказывая строго специфические координированные влияния на ход заживления. Высказывается гипотеза о том, что мастоциты по-разному реагируют на повреждение тканей с разной степенью иммунопривилегированности и, соответственно, неравноценно их участие в регуляции репаративных процессов разных тканей.

В связи с этим цель данной работы: исследование тучных клеток и основных морфометрических показателей 2

типов тканей с разной степенью иммуноприлегированности (кожи и семенника) при их повреждении, а также в условиях исключения мастоцитов из процессов регуляции путем их инактивации.

Материалы и методы. Эксперименты проведены на крысах линии Вистар. Повреждение семенника и кожи наносили путём прокола иглой диаметром 3 мм. В качестве инактиватора тучных клеток применяли препарат кетотифен, который давали перорально 2 раза в сутки в дозе 0,1 мг в течение 7 суток. Оценку тучных клеток и репаративные процессы в семенниках и коже изучали на 1, 7 и 30 сутки после операции. Значимость различий при статистической обработке экспериментального материала оценивали по непараметрическому критерию Манна-Уитни.

Результаты. При анализе морфофункционального состояния тучных клеток кожи и семенника в процессе репаративной регенерации было выявлено, что при повреждении в обеих тканях происходит увеличение количества мастоцитов и повышение их синтетической и дегрануляционной активности. Кетотифен стабилизирует мембраны тучных клеток и уменьшает, тем самым, выделение гранул в межклеточное пространство, снижая до минимума возможные регуляторные эффекты мастоцитов на клетки-мишени. Это подтверждается снижением индекса дегрануляции тучных клеток в обеих исследуемых тканях при введении препарата. Таким образом, реакция со стороны тучных клеток на повреждение является однотипной вне зависимости от вида ткани и выражается в миграции мастоцитов в зону повреждения, а также активации их деятельности за счет двух различных механизмов: увеличение количество синтезируемых гранул в своей цитоплазме и активной секреции их в межклеточное пространство. Данная реакция является ранней, т.к. развивается уже на первые сутки после повреждения.

Несмотря на однотипность реакции со стороны тучных клеток, репаративные процессы на фоне инактивации тучных клеток в двух исследуемых тканях протекали по-разному. Так, инактивация тучных клеток препаратом кетотифен тормозит процессы характерные для нормального протекания репаративной регенерации кожи: не происходит достоверного увеличения толщины дермы и эпидермиса, количества кровеносных сосудов, фибробластов и коллагеновых волокон, замедляется формирование рубца. При этом установлено, что репаративная регенерация семенника на фоне выключения тучных клеток улучшается. Это выражается, прежде всего, в сохранении и увеличении числа сперматогоний, которые являются пролиферативным пулом для всех последующих стадий сперматогенеза.

Заключение. Таким образом, количество и функциональная активность тучных клеток может служить маркером интенсивности регенераторных процессов, однако в разных тканях в зависимости от их степени иммуноприлегированности данный показатель будет свидетельствовать о разной динамике восстановления.

ДОЛГОЖИВУЩИЕ ПЛАЗМАТИЧЕСКИЕ КЛЕТКИ КОСТНОГО МОЗГА ПРИ ИММУННОМ ОТВЕТЕ НА АЛЬФА (1→3) ДЕКСТРАН

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

ФГБНУ «НИИ вакцин и сывороток им.
И.И. Мечникова», Москва, Россия

Введение. При иммунизации, помимо «обычных» плазматических клеток (ПК), образуются долгоживущие

ПК (дПК), локализующиеся преимущественно в костном мозге (КМ). В настоящее время исследуются в основном дПК, образующиеся в ответ на Т-зависимые антигены (АГ). Не меньший интерес, однако, представляет вопрос о наличии и свойствах дПК к Т-независимым АГ (ТН АГ), входящим в состав многих патогенных бактерий. Настоящая работа посвящена изучению некоторых свойств дПК при ответе на ТН АГ 2-го типа (ТН-2 АГ) и определению роли В-1а клеток в их образовании.

Материалы и методы. Опыты проводили на мышах линий СВА и СВА/Н. В качестве ТН-2 АГ использовали альфа(1→3) Декстран (Декс). Клетки костного мозга (КМ) получали из бедренных костей мышей. В1а лимфоциты выделяли из перитонеальной полости мышей СВА с помощью иммуномагнитной сепарации. Вкратце: из суспензии перитонеальных клеток вначале удаляли Т лимфоциты с помощью Dynabeads Mouse pan T (Invitrogen), оставшиеся клетки инкубировали с CD5(Ly-1) Microbeads (Miltenyi Biotec), после этого на LS колонке выделяли CD5+В-1а лимфоциты. CD138+ПК выделяли из КМ с помощью анти-CD138 магнитных бус (Miltenyi Biotec). Фенотип и чистоту выделенных клеток определяли цитометрически. Функциональную активность оценивали по количеству IgM антитело-образующих клеток (IgM-АОК) в реакции ELISPOT. Роль В-1а клеток в образовании дПК исследовали на модели адоптивного переноса.

Результаты. В норме в КМ мышей СВА содержалось ~35% CD138+ клеток. Изучение динамики образования IgM-АОК к Декс в КМ показало, что увеличение числа АОК начинается на 4-е сутки; к 14 дню оно достигало максимума (24±4 АОК/млн) и к 28-56 дням выходило на стационарный уровень (18±3 IgM-АОК/млн клеток КМ). Наличие большего количества IgM-АОК к Декс в отдаленные после иммунизации сроки (в сравнении с таковым в норме – 11±2 АОК/млн) свидетельствует об их принадлежности к дПК.

Подтверждение этому было получено в опытах с выделенными из КМ CD138+ клетками (чистота 87-97%). В CD138+ клетках КМ через месяц после иммунизации обнаруживалось в 2,7 раза больше IgM-АОК, чем у неиммунизированных мышей (352±93/млн CD138+ клеток против 131±35/млн, соответственно).

В опытах с Т-зависимыми АГ было показано, что появляющиеся дПК для синтеза и секреции АТ в присутствии АГ не нуждаются [Сидорова, 2013]. Добавление Декс (ТН-2 АГ) в культуры клеток КМ, содержащие дПК, индуцированные Декс, на функциональную активность клеток также не повлияло: число IgM-АОК в культурах с АГ и без было практически одинаковым (~28 АОК/млн). Таким образом, синтез АТ к ТН-2 АГ долгоживущими ПК является АГ-независимым.

На ТН-2 АГ отвечают, главным образом, В-1 лимфоциты, продуцирующие полиреактивные IgM-АТ. Для определения реактивности АТ, секретлируемых содержащими дПК клетками КМ мышей, с помощью ELISPOT подсчитывали количества IgM-АОК к гомологичному и гетерологичным ТН-2АГ (полисахарид пневмококка S3, Фиколл, поливинилпирролидон). Через месяц после иммунизации Декс число IgM-АОК к Декс, по сравнению с нормой, увеличивалось примерно в 2,4 раза. В то же время к увеличению числа клеток, секретлирующих АТ к гетерологичным ТН-2 АГ, иммунизация Декс не приводила. Таким образом, АТ, продуцируемые дПК, появляющимися в КМ под действием Декс, моноспецифичны.

Согласно данным литературы, АТ к ТН-2 АГ продуцируются в основном В-1b клетками. В настоящих опытах мышам хид-линии СВА/Н, не имеющим В-1 лимфоцитов, переносили В-1a клетки мышей линии СВА одновременно с Декс и без АГ, и через 28 дней в КМ мышей СВА/Н определяли число IgM-АОК, специфичных к Декс. Перенос В-1a клеток вместе с Декс в 2-х опытах из 4-х привел к увеличению в КМ реципиентов числа IgM-АОК к Декс по сравнению с их количеством в контроле.

Заключение. 1) ТН-2 АГ (Декс) индуцирует появление дПК в КМ. На «стационарный» уровень процесс выходит ~ через 28 дней. 2) дПК, образовавшиеся в ответ на введение Декс, не нуждаются в присутствии АГ. 3) IgM-АТ, продуцируемые дПК к Декс моноспецифичны. 4) В-1a клетки участвуют в образовании дПК к ТН-2 АГ (Декс).

РОЛЬ ИММУННЫХ ПРОТЕАСОМ В РЕГУЛЯЦИИ РАЗВИТИЯ ИММУННОЙ СИСТЕМЫ КРЫСЫ

Шарова Н.П., Карпова Я.Д., Люпина Ю.В., Астахова Т.М.

ФГБУН Институт биологии развития
им. Н.К. Кольцова РАН, Москва, Россия

Введение. Иммуные протеасомы – мультисубъединичные белковые комплексы, содержащие протеолитические субъединицы LMP2, LMP10 и/или LMP7 и продуцирующие антигенные эпитопы для молекул ГКГ класса I. При инфицировании клеток экспрессия новых структур иммуных протеасом осуществляется под действием гамма-интерферона. К настоящему времени еще остаются не ясными вопросы, в какой период онтогенеза появляются иммуные протеасомы в различных органах иммуной системы, с какими сигнальными путями этот процесс связан, какова роль иммуных протеасом в развитии иммуного ответа и толерантности?

Цель и задачи. Целью работы явилось выявление роли различных форм иммуных протеасом в развитии иммунокомпетентных органов, а также в регуляции иммуного ответа и толерантности у крысы. Задачи: исследование динамики экспрессии иммуных субъединиц LMP7 и LMP2 протеасом в эмбриональном и раннем постнатальном онтогенезе тимуса, селезенки и печени – гемопоэтическом органе в эмбриогенезе. Кроме того, в задачу входило исследование динамики экспрессии молекул ГКГ класса I и нейрональной NO-синтазы (nNOS), как возможного регулятора экспрессии иммуных протеасом, а также особенностей экспрессии субъединиц LMP7 и LMP2 в эмбриональной печени после воздействия эндотоксина ЛПС (*E. coli*) на ранних сроках беременности.

Материалы и методы. Работа проводилась на крысах Вистар. ЛПС вводили в/б (18 мкг/кг) на 12-й день беременности. Динамику экспрессии иммуных субъединиц протеасом, молекул ГКГ класса I и nNOS в осветленных гомогенатах органов оценивали методом Вестерн-блоттинга. Экспрессию иммуных протеасом в клетках органов исследовали методами двойного иммунофлуоресцентного мечения и проточной цитометрии.

Основные результаты. Показано, что в тимусе содержание субъединиц LMP7 и LMP2 возрастает к 21-му дню эмбрионального развития (Э21) и остается на этом уровне в постнатальный период (П). Наиболее обогащенными иммуными субъединицами оказались дендритные и эпителиальные клетки кортикальной и медуллярной зон тимуса. Для селезенки и печени обнаружено повы-

шение экспрессии обеих иммуных субъединиц на П21 по сравнению с эмбриональным периодом при постоянном общем уровне протеасом. Повышение экспрессии субъединиц LMP7 и LMP2 в раннем развитии селезенки связано с процессом последовательного формирования белой пульпы В- и Т-лимфоцитами, обогащенными иммуными субъединицами. В печени же повышение уровня иммуных субъединиц к П21 сопровождалось повышением их экспрессии в гепатоцитах. В селезенке и печени выявлялись молекулы ГКГ класса I в периоды повышения уровня иммуных протеасом. На Э21 печень была обогащена nNOS, уровень которой падал после рождения, незадолго до падения уровня иммуных протеасом, и повышался к П18. Вероятно, в индукцию экспрессии иммуных субъединиц в гепатоцитах включаются сигнальные пути с участием nNOS. Пренатальное воздействие ЛПС приводило к повышению уровня обеих иммуных субъединиц в печени плода на Э19. В макрофагах – клетках, участвующих в развитии толерантности к пищевым продуктам, локализация субъединиц LMP7 и LMP2 различалась. Субъединица LMP7 была распределена равномерно по цитоплазме, тогда как субъединица LMP2 выявлялась в псевдоподиях и околочелювном пространстве макрофагов.

Заключение. Функции иммуных протеасом, содержащих субъединицу LMP2, могут быть связаны с развитием толерантности к «чужому» в печени. В то же время, иммуные протеасомы, содержащие субъединицы LMP7 и LMP2, участвуют в развитии толерантности к «своему» в тимусе и запускают Т-клеточный иммуный ответ. Причем толерантность к «своему» начинает развиваться еще в эмбриогенезе как в кортикальной, так и в медуллярной зонах тимуса. Полноценный Т-клеточный иммуный ответ, развивающийся в селезенке по отношению к клеткам печени, у крыс возможен начиная с периода П19–21. Во-первых, в этот период сформирована Т-зона белой пульпы селезенки из Т-лимфоцитов, содержащих иммуные протеасомы. Во-вторых, повышенный уровень иммуных протеасом и молекул ГКГ класса I в гепатоцитах может обеспечить образование антигенных эпитопов из чужеродных белков и доставку их на поверхность клеток для предъявления цитотоксическим Т-лимфоцитам.

Работа частично поддержана РФФИ (грант № 15-04-03494).

ВЛИЯНИЕ ИНТЕРЛЕЙКИНА-7 НА ИНДУЦИРОВАННУЮ АКТИВАЦИЮ Т-КЛЕТОЧНЫХ СУБПОПУЛЯЦИЙ

Шмаров В.А., Малащенко В.В., Меняйло М.Е., Газатова Н.Д., Тодосенко Н.М., Мельников А.Е., Мелащенко О.Б., Исмаилова А.З., Найдунуова В.Г.

ФГАОУ ВПО «Балтийский федеральный университет имени Иммануила Канта», Калининград, Россия

Введение. Интерлейкин-7 (IL-7, interleukin-7) играет важную роль в созревании и размножении клеток лимфоидного ряда и, в частности, Т-лимфоцитов. Показана его значимость в процессе самоподдержания Т-клеток памяти. Вместе с тем, влияние IL-7 на индуцированную активацию периферических Т-лимфоцитов мало исследовано.

Цель работы было изучить влияние IL-7 на степень индуцированной активации

Т-хелперов (CD3+CD4+), цитотоксических Т-лимфоцитов (CD3+CD8+), наивных Т-клеток (CD45RA+CD197+; na ve), центральных (CD45RA-

ТАБЛИЦА. ВЛИЯНИЕ IL-7 НА ИНДУЦИРОВАННУЮ АКТИВАЦИЮ Т-КЛЕТОЧНЫХ СУБПОПУЛЯЦИЙ (К ТЕЗИСАМ ШМАРОВА В.А. И ДР.)

Показатель	Уровень экспрессии мембранной молекулы CD25 (M±m, %)*			
	Контроль	ФГА	ИЛ-7	ФГА + ИЛ-7
CD3+	1,0±0,20	5,7±1,10	2,1±0,32	13,8±2,30
CD3+CD4+:	0,5±0,11	8,2±2,00	1,5±0,42	16,1±2,70
-naïve	0,1±0,03	7,5±1,90	0,4±0,05	16,3±3,10
-CM	0,7±0,23	8,1±2,30	2,2±1,10	11,8±0,90
-EM	2,5±0,70	16,2±3,70	6,1±1,90	22,8±3,50
-TEMRA	0,4±0,08	13,0±2,80	13,3±1,30	17,8±2,60
CD3+CD8+:	0,7±0,05	9,8±3,10	1,5±0,24	16,4±1,40
-naïve	0,5±0,03	12,1±2,50	1,4±0,21	20,7±2,30
-CM	1,6±0,40	9,3±2,00	6,2±1,80	13,1±1,90
-EM	2,4±0,90	4,8±0,45	1,6±0,05	3,8±0,23
-TEMRA	0,9±0,21	3,0±0,30	0,7±0,08	1,9±0,11

* - p < 0,05

CD197+; CM), эффекторных Т-клеток памяти (CD45RA-CD197-; EM), а также терминально-дифференцированных эффекторных клеток (CD45RA+CD197-; TEMRA).

Материалы и методы. Мононуклеарные клетки (МНК) выделяли из крови 10 условно здоровых доноров (5 мужчин и 5 женщин в возрасте от 18 до 45 лет) и культивировали (1x10⁶/мл) в течение 24 часов в присутствии активаторов - фитогемагглютинаина (ФГА, 5 мкг/мл) и IL-7 (10 нг/мл), или без них в контроле. Уровень активации субпопуляций Т-клеток оценивали методом проточной цитометрии по экспрессии молекулы CD25 (альфа цепь рецептора IL-2).

Результаты. Как показано в таблице, IL-7 усиливает индуцируемую ФГА активацию Т-хелперов (CD3+CD4+), цитотоксических Т-клеток (CD3+CD8+), наивных Т-лимфоцитов (CD45RA+CD197+), а также центральных Т-клеток памяти (CD45RA-CD197+). Вместе с тем IL-7 несколько снижал уровень активации цитотоксических эффекторных Т-клеток памяти (CD3+CD8+CD45RA-CD197-) и цитотоксических терминально-дифференцированных эффекторных Т-клеток (CD3+CD8+CD45RA+CD197-).

Выводы. IL-7 способен усиливать активацию наивных Т-лимфоцитов и центральных Т-клеток памяти, обладающих значительным пролиферативным потенциалом. Вместе с тем, IL-7 способен сдерживать активацию эффекторных Т-клеток памяти и терминально-дифференцированных эффекторных Т-клеток, имеющих низкий ростовой потенциал.

ЭФФЕКТЫ IL-2 НА КОНВЕРСИЮ ФЕНОТИПА TCR-АКТИВИРОВАННЫХ НАИВНЫХ Т-ЛИМФОЦИТОВ IN VITRO

Юрова К.А., Сохоневич Н.А., Хазиахматова О.Г., Литвинова Л.С.

ФГАОУ ВПО «Балтийский федеральный университет имени Иммануила Канта», Калининград, Россия

Исследование клеточных механизмов дифференцировки лимфоцитов чрезвычайно важно для понимания феномена иммунологической памяти. Цитокины играют

ключевую роль в регуляции клеточного гомеостаза, оказывая комплексное воздействие на процессы активации и созревания Т-лимфоцитов (Ярилин А.А., 2010; Litvinova L.S. et al., 2013).

Целью работы явилась оценка влияния гIL-2 на конверсию фенотипа наивных Т-клеток в условиях клеточного культивирования in vitro на фоне TCR-активации.

Материалы и методы. Материалом исследования служила венозная кровь 58 здоровых доноров (26 женщин, 26 мужчин в возрасте 18-35 лет). Популяцию наивных (CD3+CD45RA+CD62L+) Т-лимфоцитов получали из взвеси мононуклеарных клеток методом иммуномагнитной сепарации (MidiMACS Separator, LS Columns, Miltenyi Biotec, Германия). CD3+CD45RA+CD62L+ Т-клетки инкубировали 48 часов (37 С и 5% CO₂) в бессывороточной среде Искова в присутствии рекомбинантной формы цитокина IL-2 и клеточного активатора. В качестве активатора Т-лимфоцитов использовали реагент Т-Cell Activation/Expansion Kit human (Ac/Exp) («Miltenyi Biotec», Германия) - антибиотинные частицы MACSiBeadtm с биотинилированными антителами против CD2+, CD3+, CD28+ человека. Ac/Exp добавляли в пробы в количестве 5 мкл, которые содержали - 0,5*10⁶ анти-биотинных MACSiBeadtm частиц. Соотношение CD3+CD45RA+CD62L+ - клеток и активирующих частиц составляло 1:2.

В эксперименте были использованы следующие варианты культивирования: 1) интактная проба; 2) проба с добавлением Ac/Exp; 3) пробы с добавлением Ac/Exp и гIL-2 (0,1x10⁻⁹ г/мл; 0,5x10⁻⁹ г/мл; 1,0x10⁻⁹ г/мл). Содержание CD3+CD45RA+CD62L+ Т-клеток, несущих молекулу CD28, а также число дубль-позитивных CD45RA+/CD45RO+ Т-клеток определяли методом проточной цитофлуориметрии с помощью МКАТ, конъюгированных с FITC, PE и APC («Abcam», Великобритания; «e-Bioscience», США). Анализ поверхностных маркеров проводили на проточном цитофлуориметре «MACS Quant» («Miltenyi Biotec», Германия).

Результаты. Процессы созревания и дифференцировки наивных (CD3+CD45RA+CD62L+) Т-лимфоцитов в Т-клетки памяти или эффекторы сопровождаются появлением коротких изоформ рецептора CD45 – CD45RO

вместо высокомолекулярных — CD45RA, а также потерей экспрессии молекул - CD62L, CD28 и CD27 (Litvinova L.S. et al., 2013). Установлено, что добавление в культуру наивных лимфоцитов анти-CD2/CD3/CD28-частиц, имитирующих действие антиген-презентирующих клеток, приводит к стимуляции Т-клеточного рецептора (TCR) и корецепторных молекул (CD28, CD58), что способствует формированию иммунного синапса и активации клетки (Ярилин А.А., 2010).

Культирование наивных CD3+CD45RA+CD62L+ Т-лимфоцитов с CD2/CD3/CD28-активатором и gIL-2, наряду с ростом количества клеток (в мл) и увеличением их жизнеспособности, приводило к значительному повышению числа лимфоцитов, несущих мембранные маркеры переходных клеток (CD45RA+/CD45RO+) и, соответственно, Т-клеток памяти (CD45RO+) при одновременном снижении числа CD28+CD62L+ Т-клеток. Изменения равномерно затрагивали CD4+ и CD8+ популяции Т-клеток. Эффекты gIL-2 носили дозозависимый характер.

Выводы. gIL-2 на фоне TCR-активации обладает способностью усиливать созревание и дифференцировку наивных Т-клеток в Т-лимфоциты иммунной памяти и эффекторные клетки, что фенотипически сопровождается повышенной экспрессией маркера CD45RO+, увеличением числа дубль-позитивных CD45RA+/CD45RO+ Т-лимфоцитов, а также снижением содержания CD28+CD62L+ Т-клеток.

Работа выполнена в рамках стипендии Президента РФ (СП-454.2013.4) и субсидии на выполнение государственной работы «Организация проведения научных исследований» (№603).

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ МЕХАНИЗМОВ ИММУННОЙ ЗАЩИТЫ В ДИНАМИКЕ ФТОРИСТОЙ ИНТОКСИКАЦИИ

Ядыкина Т.К., Михайлова Н.Н., Уланова Е.В.,
Алехина Д.А., Жукова А.Г.

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт комплексных проблем гигиены и профессиональных заболеваний», Новокузнецк, Россия

Хронические интоксикации занимают одно из ведущих мест среди причин, вызывающих производственно обусловленные заболевания. Так, длительное воздействие фтористых соединений на работников алюминиевого производства, является определяющим фактором развития профессионального флюороза, патогенез которого вызывает многочисленные суждения и споры. При этом, изменение иммунного статуса — наиболее чувствительный показатель ответной реакции организма на действие того или иного ксенобиотика. На длительную антигенную нагрузку организм реагирует либо гетерогенным защитным ответом, проявляющимся в угнетении и/или активации отдельных звеньев иммунной системы, либо в полной полифункциональной несостоятельности. Изменение иммунного статуса, направленного на поддержание гомеостаза организма в условиях длительной фтористой нагрузки изучено недостаточно, представлены лишь фрагментарные данные о функциональном состоянии отдельных ее звеньев причём, как правило, уже на стадии хронической формы заболевания. Почти нет

данных о состоянии иммунного статуса на ранних стадиях развития флюороза. В этой связи целью данного исследования явилось экспериментальное изучение механизмов иммунной защиты организма в динамике хронической фтористой интоксикации (ХФИ).

Материал и методы. Эксперименты проведены на белых нелинейных крысах-самцах массой 200-250 г. Животных делили на 2 группы: контроль (n=10); опыт (n=40), с ХФИ (свободный доступ крыс к раствору NaF в концентрации 10 мг/л в течение 12 недель). Для изучения иммунологических показателей исследовали кровь, забор которой осуществляли из хвостовой вены через 1,3,6,9,12 недель эксперимента. Унифицированными методами определяли: уровень белков острой фазы воспаления (БОФВ) - гаптоглобина (Hr), церулоплазмينا (Ср); сывороточных иммуноглобулинов (Ig) А, М, G; общее количество лейкоцитов; цитокинов (TNF- α , IL-4,6,8,10). Статистический анализ полученных результатов проводили на основе вычисления средних значений показателей (M) и их ошибок ($\pm m$). Различия между выборками оценивали по t-критерию Стьюдента и считали достоверными при $p \leq 0,05$.

Результаты. На ранних стадиях фтористой агрессии (1-3 недели) ответная реакция организма характеризовалась активацией клеточного иммунитета с последующим запуском цитокинового каскада. Наблюдалось полукратное увеличение количества лейкоцитов по сравнению с контролем, сохраняющееся до 6-й недели. На 9-12-й неделях ХФИ число лейкоцитов снизилось в 1,3 раза. Анализ лейкоцитарной формулы показал, что начало травмы сопровождалось достоверным снижением числа лимфоцитов — особо чувствительных клеток к воздействию повреждающих факторов, на фоне достоверного увеличения числа моноцитов, участвующих в формировании и регуляции первичного иммунного ответа. На 1-й неделе отмечено достоверное повышение ключевого медиатора иммунного ответа — TNF- α с сохранением его высоких концентраций до конца эксперимента, что объясняется его вовлеченностью не только в эффекторное, но и регуляторное звено иммунной реактивности организма. Индукция раннего синтеза TNF- α привела к достоверному повышению концентрации БОФВ (Hr и Ср), что следует рассматривать как защитную реакцию организма, направленную на предупреждение развития «окислительного стресса». Повышение TNF- α коррелировало со снижением уровня противовоспалительных цитокинов (IL-4, IL-10). Провоспалительные IL-6 и IL-8 сохранялись в физиологических пределах. На начальной стадии развития ХФИ данные механизмы выступают в качестве первой линии защиты организма, физиологический характер которой подтверждается отсутствием изменений в гуморальном звене иммунитета. Уровень Ig сохранялся в пределах физиологической нормы до 6-й недели ХФИ.

С 6-й недели запускается воспалительный процесс, развитие которого подтверждается достоверным повышением уровня нейтрофилов и индукцией синтеза IL-6 на фоне достоверно высокого значения TNF- α , свидетельствуя о развитии системного воспалительного ответа и обеспечивая синтез основного БОФВ — Hr. Длительно сохраняющийся (с 6-й до 9-й недели эксперимента), достоверно высокий уровень Hr, в 3 раза превышающий контрольные значения, является неблагоприятным прогностическим признаком. При длительном фтористом

воздействии происходит изменение иммунного статуса, обусловленное постепенным накоплением фтора в органах и тканях. Снижение иммунной реактивности подтверждается изменением состояния гуморального звена иммунитета: с 9-й недели достоверно снизилась концентрация IgM и IgG на фоне увеличения количества лимфоцитов при снижении общего числа лейкоцитов, свидетельствуя об иммунодефиците.

Заключение. Представленные иммунологические показатели крови характеризуют иммунологический статус организма в условиях ХФИ и могут служить биохимическими маркерами стадий развития патологического процесса, с определением периода иммунодефицитного состояния, являющегося пусковым фактором трансформации интоксикации в форму хронического заболевания.

INFLUENCE OF PROBIOTIC ADMINISTRATION ON THE IMMUNE MECHANISMS OF PRO-INFLAMMATORY SIGNALING ACTIVATION IN RATS GALT IN CONDITIONS OF CHRONIC SOCIAL STRESS

Topol I. A., Kamyshny A. M.

*Department of Microbiology, Virology and Immunology,
Zaporozhye State Medical University, Zaporozhye, Ukraine*

Abstract. Investigated the influence of chronic social stress and modulation of intestinal microflora with probiotics on the distribution of TLR2+/4+-, NF-kB+ -, XBP1+ - lymphocytes in the gut-associated lymphoid tissue.

Methods: Researches have been conducted on 70 rats (female) of Wistar line, which were divided on 5 experimental groups: control rats (group 1); rats, which were modeled CSS1 by means of three weeks social isolation and prolong psychoemotional influence (group2); rats, which having CSS 2

modeling by means of keeping animals in over populated cages with every day change of grouping (group 3); rats with CSS1 and CSS2, which were made the modeling of intestinal microflora by means of everyday administrations of lactobacterine (groups 4 and 5, accordingly). Structure of population of TLR2+-, TLR4+-, Nf-kB+- and XBP1+ - cells has been studied by the analysis of serial histological sections using the method of direct and indirect immunofluorescence with monoclonal antibodies to TLR2, TLR4, Nf-kB and XBP1. We investigated lymphoid follicles (LF) and subepithelial zone (SZ) Peyer's patches (PP) and lymphocyte-filled villi (LFV), which are separate and distinct compartment in GALT line Wistar rats.

Results: It has been established that the CSS development leads to a significant activation of the innate immune system and accompanied by an increase expression of TLR2, TLR4, transcription factors Nf-kB, which leads to raising the level of pro-inflammatory signaling in the gut. In addition, it has been shown that on the background of chronic social stress develops endoplasmic reticulum stress, which is accompanied by a unidirectional trend to reduce the total number of XBP1+ cells, and the concentration change XBP1 immune cells depends on the type of stress. Modulation of the composition of intestinal microflora by probiotics at CSS accompanied by an increase of total number of TLR4+-, Xbp1+ lymphocytes, reduces the total number of TLR2+-, Nf-kB+- cells in GALT and depends on the kind of stress.

Conclusions: the discovered alterations of TLR2/4, NF-kB, Xbp1 expression under stress may be one of the triggers for development of autoimmune and IBD. And, given the fact that in some cases the receiving of LB can increase the pro-inflammatory signaling, increased understanding of the molecular actions and transcriptional networks regulated by NF-kB and XBP1 in immune cells may aid in the development of potential therapeutics targeting immune disorders.