

*На правах рукописи*

ФАЙЗРАХМАНОВ Ринат Рустамович

**ОЦЕНКА ИММУНОМОДУЛИРУЮЩЕГО ДЕЙСТВИЯ  
ПРОФЕТАЛЯ ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ ПРОНИКАЮЩЕМ  
РАНЕНИИ ГЛАЗА**

14.00.36 - аллергология и иммунология

Автореферат на соискание ученой степени  
кандидата медицинских наук

Екатеринбург – 2007

Работа выполнена в лаборатории иммунофизиологии Института иммунологии и физиологии УрО РАН, Екатеринбург

**Научные руководители:**

доктор медицинских наук, профессор  
доктор медицинских наук

**Черешнева Маргарита Владимировна**  
**Гаврилова Татьяна Валерьевна**

**Официальные оппоненты:**

доктор медицинских наук  
доктор медицинских наук

**Гусев Евгений Юрьевич**  
**Чистякова Гузель Нуховна**

**Ведущая организация:** ГНЦ – Институт иммунологии ФМБА России, Москва

Защита состоится 24 мая 2007 г. в \_\_\_ часов на заседании диссертационного совета Д. 004.027.01 при Институте иммунологии и физиологии УрО РАН по адресу:  
620041, г. Екатеринбург, ул. Первомайская, 91  
Факс (343) 374-00-70

С диссертацией можно ознакомиться в Центральной научной библиотеке УрО РАН (620041, г. Екатеринбург ул. С. Ковалевской, д. 22/20), с авторефератом - на сайте Института иммунологии и физиологии УрО РАН - <http://www.iip.uran.ru>

Автореферат разослан «\_\_\_» апреля 2007г.

Ученый секретарь  
диссертационного совета,  
доктор медицинских наук,  
профессор

И.Н. Тузанкина

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**Актуальность проблемы.** Феномен иммунной привилегированности глаза привлекает внимание современных исследователей [Архипова Л.Т., 2000, 2006; Слепова О.С. и др., 2005; Гундорова Р.А. и др., 2006; Черешнева М.В. и др., 2006; Martin-Fontecha A. et al., 2003; Novak N. et al., 2003; Streilein J., 2003; Yanoff M. et al., 2004]. При проникающем ранении глаза (ПРГ) развивается комплекс типовых изменений в иммунной системе, в том числе системных [Архипова Л.Т., 2000, 2006; Слепова О.С. и др., 2005], являющихся общими для травмы в целом, несмотря на ограниченный по объему характер повреждения. В частности, при ПРГ как у человека, так и у животных важную роль играют стрессорные изменения в иммунной системе [Черешнева М.В. и др., 2006] и развитие синдрома вторичной комбинированной иммунной недостаточности [Волик Е.И., 2000; Черешнева М.В., 2000; Гаврилова Т.В. и др., 2005].

Одним из подходов к иммунокоррекции является включение наряду с антибиотиками, стероидными и нестероидными противовоспалительными средствами современных отечественных иммуномодуляторов [Архипова Л.Т., 2000; Волик Е.И., 2000; Черешнева М.В., 2000; Гаврилова Т.В., 2006]. Среди них перспективен отечественный препарат «Профеталь» (далее профеталь), действующее вещество которого – сывороточный белок альфа-фетопротейн (АФП) [Родионов С.Ю. и др., 1997; Черешнев В.А. и др., 2004]. В настоящее время он положительно зарекомендовал себя при лечении заболеваний, протекающих с иммунными нарушениями [Родионов С.Ю. и др. 1997, 2006; Черешнев В.А. и др., 2003, 2004]. Показано, что в системе *in vitro* профеталь усиливает дифференцировку и цитотоксическую активность НК-клеток, дифференцировку и экспрессию костимулирующих молекул дендритными клетками [Гаврилова Т.В., 2006; Лебединская О.В., 2006]. Однако многие аспекты механизма иммуномодулирующего действия профетали остаются неизученными. Дальнейшее исследование характера изменений иммунной системы при ПРГ и

разработка патогенетически обоснованных методов их коррекции определяют актуальность данной проблемы.

**Цель работы** – исследовать характер изменений иммунной системы и их коррекцию профеталем при экспериментальном проникающем ранении глаза.

### **Основные задачи**

1. Оценить эффект действия проникающего ранения глаза и профеталя в варианте монотерапии и при комбинации со стандартной терапией на процессы антителогенеза, выраженность реакции гиперчувствительности замедленного типа, клеточность органов лимфомиелоидного комплекса.

2. Исследовать влияние проникающего ранения глаза и действие профеталя на фагоцитарную активность клеток лимфатических узлов, периферической крови и брюшной полости.

3. Изучить воздействие проникающего ранения глаза и профеталя на частоту выявления антител в плазме периферической крови к аутоантигенам тканей глаза.

4. Исследовать изменение содержания альфа-фетопротеина в плазме периферической крови экспериментальных животных в зависимости от схем введения профеталя.

5. Оценить морфологическую картину травматического воспаления при проникающем ранении глаза в условиях разных схем введения профеталя.

**Научная новизна.** В экспериментальной модели ПРГ крыс популяции Wistar исследованы особенности течения травматического воспаления, изменения иммунной системы, влияние на них нового отечественного иммуотропного препарата профеталя при разных схемах введения.

В работе впервые установлено: при введении профеталя в комплексе со стандартной терапией уровень АФП в плазме крови животных ниже, чем в варианте монотерапии, что указывает на необходимость учета взаимодействия профеталя с препаратами стандартной терапии. Показана возможность снижения профеталем

выраженности аутосенсibilизации. Установлено, что в условиях как изолированного, так и комбинированного введения препарата животным с ПРГ наблюдается угнетение антителообразования и степени выраженности реакции гиперчувствительности замедленного типа (ГЗТ).

Впервые выявлено, что введение профеталя отменяет ряд эффектов стандартной терапии на функции фагоцитирующих клеток, приводит к повышению интегральных показателей моноцитарного фагоцитоза и числа моноцитов крови при отсутствии влияния на поглотительную активность нейтрофилов и эозинофилов периферической крови; наблюдается активация поглотительной способности перитонеальных мононуклеарных фагоцитов и увеличение их количества, а также стимуляция фагоцитарной активности тучных клеток; в регионарном лимфатическом узле снижаются показатели суммарной фагоцитарной активности клеток.

Впервые обосновано восстановление тканевых дефектов за счет репаративной регенерации при использовании профеталя как в монотерапии, так и при комбинированном введении с другими препаратами.

**Теоретическая и практическая значимость работы.** В теоретическом плане исследования существенно расширяют представления о роли иммунной системы в патогенезе ПРГ и дополняют сведения об иммуотропном действии профеталя в условиях индуцированного изменения функций иммунной системы при данном виде патологии: показана высокая иммуномодулирующая активность препарата.

В практическом плане полученные результаты демонстрируют перспективность дальнейшего изучения возможности использования профеталя для коррекции иммунных нарушений при аутоиммунных заболеваниях глаза.

**Внедрение в практику.** Основные положения диссертации используются при чтении лекций студентам, магистрам, аспирантам биологического факультета Пермского государственного университета. Фрагменты работы вошли в материалы

доклинического испытания профетала и были представлены в Фармакологический комитет РФ для получения разрешения на его производство.

### **Основные положения, выносимые на защиту**

1. Проникающее ранение глаза вызывает ряд изменений иммунной системы, включая стимуляцию гуморального и клеточноопосредованного иммунного ответа, модуляцию функций фагоцитирующих клеток, регенеративной активности зоны повреждения, провоцируя развитие аутоиммунного ответа к тканям глаза.

2. Применение стандартной терапии, экстраполированной со схем, используемых в клинике у пострадавших с проникающим ранением глаза, усугубляет развитие дисфункции иммунной системы при сохранении воспалительной инфильтрации и рубцовых изменений в поврежденной ткани.

3. Включение профетала в комплексную патогенетическую терапию травматических и стрессорных изменений функций иммунной системы оптимизирует течение воспалительного процесса при экспериментальном проникающем ранении глаза.

**Апробация работы.** Основные положения работы доложены и обсуждены на VI Международной конференции «Проблемы загрязнения окружающей среды» ICER - 2005 (Пермь–Казань–Пермь, 2005); Российском научном симпозиуме «Цитокины. Стволовые клетки. Иммунитет» (Новосибирск, 2005); VIII Всероссийском научном форуме с международным участием «Дни иммунологии в Санкт-Петербурге» (Санкт-Петербург, 2006); IV Евро-Азиатской конференции по офтальмохирургии (Екатеринбург, 2006); X Международной Пущинской школы-конференции молодых ученых (Пущино, 2006); V конференции иммунологов Урала (Оренбург, 2006); Всероссийской конференции молодых ученых «Иммунитет и аллергия: от эксперимента к клинике» (Пермь, 2006).

Диссертационная работа апробирована и обсуждена на заседании научной проблемной комиссии по аллергологии и иммунологии ИИФ УрО РАН (г. Екатеринбург, 2007).

**Публикации.** Основные положения диссертации изложены в 13 печатных работах, в том числе 4 публикации (3 статьи, 1 материалы конференции) в научных журналах, рекомендованных ВАК РФ.

**Связь работы с научными программами.** Диссертационная работа выполнена в соответствии с планом НИР ИИФ УрО РАН, является частью исследований по теме «Иммунологическая регуляция физиологических функций в норме и при патологических процессах» (номер госрегистрации 01.120.0411946). Выполнение работы поддержано грантами для молодых ученых УрО РАН, Программы Президиума РАН «Молекулярная и клеточная биология» и интеграционного проекта фундаментальных исследований, проводимых в УрО РАН совместно с СО и ДВО РАН «Коррекция стрессорных и травматических нарушений функций иммунной системы в экспериментальной модели проникающего ранения глаза».

**Объем и структура диссертации.** Диссертация изложена на 185 страницах машинописного текста, состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов, 3 глав собственных экспериментальных исследований, заключения, выводов. В диссертации 3 рисунка, 39 таблиц. Прилагаемый список литературы включает 313 наименования (204 отечественных и 109 зарубежных).

## СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

**Материалы и методы.** Эксперимент выполнен на 116 крысах-самцах популяции Wistar массой  $237,7 \pm 3,6$  г.

Проведены две серии исследований в оригинальной экспериментальной модели проникающего ранения глаза у крыс [Черешнева М.В. и др., 1999].

В I серии эксперимента (51 крыса) изучали действие профеталя\* на иммунный ответ ко ксеногенному антигену и функции фагоцитирующих клеток. Под местной анестезией 2% раствором новокаина в специально сконструированном приспособлении-фиксаторе микролезвием наносили проникающее ранение правого глаза 41 животному. Сформированы экспериментальные группы: 1-я (n=10) – ПРГ и введение 0,85% раствора NaCl; 2-я (n=11) – ПРГ со стандартной терапией, экстраполированной со схем, используемых в клинике (ампициллин 12,5 мг/кг массы тела, гентамицин 1,5 мг/кг, диклофенак натрия 0,5 мг/кг – два раза в день, дексаметазон 0,1 мг/кг – один раз в день); 3-я (n=10) – ПРГ со стандартной терапией и профеталем; 4-я (n=10) – ПРГ с введением профеталя. Последний в 3-й и 4-й группах вводили в дозе 1 мкг/кг массы тела ежедневно по одной инъекции. Контролем служили нетравмированные животные 5-й группы (n=10), которые получали по тем же схемам 0,85% раствор NaCl. Введение препаратов подкожно начинали через 365 мин после нанесения травмы и продолжали ежедневно в течение 13 суток. Для моделирования локального иммунного ответа на 9-е сутки после нанесения травмы всех животных сенсibilизировали эритроцитами барана ( $10^8$  клеток вводили подкожно в подошвенную поверхность правой стопы). На 4-е сутки после сенсibilизации вводили разрешающую дозу антигена ( $10^9$  эритроцитов барана подкожно в правую стопу). Животных выводили из эксперимента на 14-е сутки методом декапитации под эфирным наркозом. Оценивали гуморальный ответ по числу антителообразующих клеток (АОК) в регионарном, по отношению к месту иммунизации, (правом подколенном) и отдаленном (левом подколенном) лимфатических узлах, селезенке методом локального гемолиза в геле агарозы [Jerne N., Nordin A., 1963]; выраженность иммунного воспаления при реакции ГЗТ путем регистрации толщины

---

\* Выражаю благодарность д.м.н. С.Ю. Родионову за любезно предоставленный препарат профеталь.



(инженерным микрометром) опытной и контрольной стопы [Toichi E. et al., 1997]; число ядросодержащих клеток (ЯСК) в органах лимфомиелоидного комплекса. Оценивали фагоцитарную активность клеток регионарного лимфатического узла [Shilov Ju. et al., 2001], перитонеальных фагоцитов [Шилов Ю.И., Ланин Д.В., 2001] и лейкоцитов периферической крови [Каплин В.Н., 1996; Shilov Ju., Orlova E., 2003] по отношению к формализированным эритроцитам барана.

Исследование патоморфологических изменений глаз проводили совместно с зав. лабораторией морфологии ИИФ УрО РАН, к.м.н. С.Ю. Медведевой по методике В.Н. Архангельского [1957]. Морфометрическую оценку гистологических срезов осуществляли с помощью окулярной стереометрической сетки Г.Г. Автандилова [2002]. Определяли количество клеток и плотность волокон в  $0,01 \text{ мм}^2$  сетки. Митотическую активность многослойного плоского эпителия (МПЭ) роговицы глаза оценивали по митотическому индексу в ‰.

Во II серии эксперимента исследовали влияние профетала на наличие аутоантител (АТ) в плазме периферической крови к аутоантигенам тканей глаза и уровень АФП в плазме крови крыс в условиях разных схем введения препарата. ПРГ наносили 50 животным, которые были разделены на 5 групп по 10 в каждой: 1-я группа – ПРГ и введение 0,85% раствора NaCl в течение 29 суток; 2-я – ПРГ со стандартной терапией (схема аналогична использованной в I серии эксперимента) в течение 13 суток; 3-я – ПРГ со стандартной терапией в течение 13 суток и введением профетала в течение 29 суток; 4-я – ПРГ с введением профетала в течение 29 суток; 5-я – ПРГ со стандартной терапией и введением профетала в течение 13 суток. Профеталь вводили в дозе 1 мкг/кг массы тела один раз в день утром. Введение всех препаратов подкожно начинали через 365 мин после нанесения травмы. Контролем служили интактные животные (6-я группа, n=10). Образцы крови получали из сосудов хвоста на 30-е сутки после ПРГ. АТ определяли методом твердофазного иммуноферментного

анализа (ИФА)\* с оценкой результатов в полуавтоматическом режиме на анализаторе MultiscanPlus («Labsystems», Finland) по изменению оптической плотности относительно контрольного образца согласно инструкции производителя [Яковлева В.Г., Сибиряк С.В., 1999, 2000]. Концентрацию АФП определяли совместно с к.б.н. Е.Г. Орловой методом ИФА (тест - система ИФА-АФП-1 фирмы «АЛКОР БИО», Санкт-Петербург, Россия) с использованием «сэндвич»-варианта по инструкции производителя.

Статистический анализ результатов проводили методами описательной статистики, однофакторного дисперсионного анализа и апостериорного критерия Дункана (post-hoc Duncan's test) для множественного сравнения между группами. Результаты представлены в виде средней арифметической и ее стандартной ошибки ( $M \pm m$ ). Данные по числу АОК с учетом их log-нормального распределения перед проведением дисперсионного анализа предварительно преобразовывали в значения  $\log_{10}$  для количества АОК [Лозовой В.П. и др., 1989] Для оценки достоверности различий, связанных попарно данных, применяли вариант  $t$ -критерия Стьюдента, критерий  $\chi^2$ . Для исследования статистической связи между наличием АТ в периферической крови к антигенам тканей глаза и схемой проводимой терапии использовали критерий  $\chi^2$ .

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

### **1. Влияние профетали на иммунный ответ ко ксеногенному антигену и функции фагоцитирующих клеток при экспериментальном проникающем ранении глаза**

*Влияние профетали на гуморальный иммунный ответ.* Наибольшие изменения выявляются в регионарном лимфатическом узле. У животных с ПРГ наблюдается

---

\* Выражаю благодарность д.м.н., профессору С.В. Сибиряку за любезно предоставленные тест-системы.

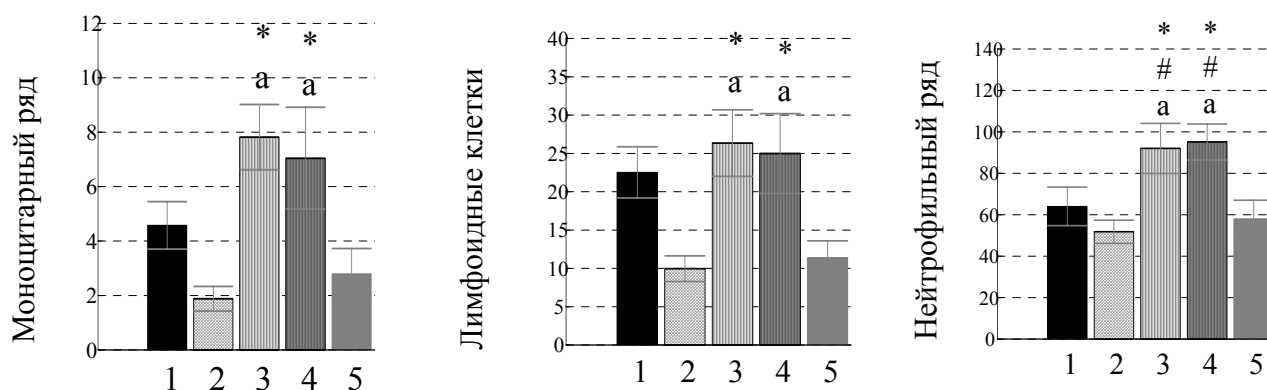
стимуляция гуморального иммунного ответа с достоверным увеличением числа АОК. Введение одного профетала или препаратов стандартной терапии угнетает образование антителопродуцентов, при их комбинации усиления иммунодепрессивного эффекта воздействий не обнаружено. В отдаленном лимфатическом узле статистически значимых изменений количества АОК на фоне всех экспериментальных воздействий не определяется. Изменение антителопродукции на территории регионарного лимфатического узла свидетельствует о локальном характере иммунного ответа. При введении профетала число АОК в селезенке достоверно снижается в сравнении с показателями травмированных животных. Суммации депрессивных эффектов стандартной терапии и профетала не выявляется.

*Влияние профетала на клеточноопосредованный иммунный ответ.* В группе животных с ПРГ наблюдается стимуляция реакции ГЗТ. Введение препаратов стандартной терапии приводит к выраженному угнетению реакции ГЗТ; сходный, но менее выраженный эффект выявлен при введении профетала. При комбинированном использовании профетала и препаратов стандартной терапии степень выраженности угнетения реакции ГЗТ нарастает по сравнению с введением одного профетала и достоверно не отличается от показателей животных, получавших только стандартную терапию.

*Влияние профетала на клеточность органов лимфомиелоидного комплекса.* При ПРГ у крыс в регионарном лимфатическом узле в сравнении с отдаленным значительно увеличивается клеточность ( $p < 0,05$ ). Подобные изменения, по-видимому, связаны с рекрутированием иммунокомпетентных клеток и их пролиферацией *in situ* [Drayson M. et al., 1981; Martin-Fontecha A. et al., 2003]. Стандартная терапия значительно снижает число ЯСК. Направленность действия профетала аналогична, но суммации эффекта при комбинированном воздействии не наблюдается. Изменения клеточности отдаленного лимфатического узла отсутствуют. В селезенке обнаружено снижение клеточности ( $p < 0,05$ ) у животных, получавших профеталь в комплексе со стандартной

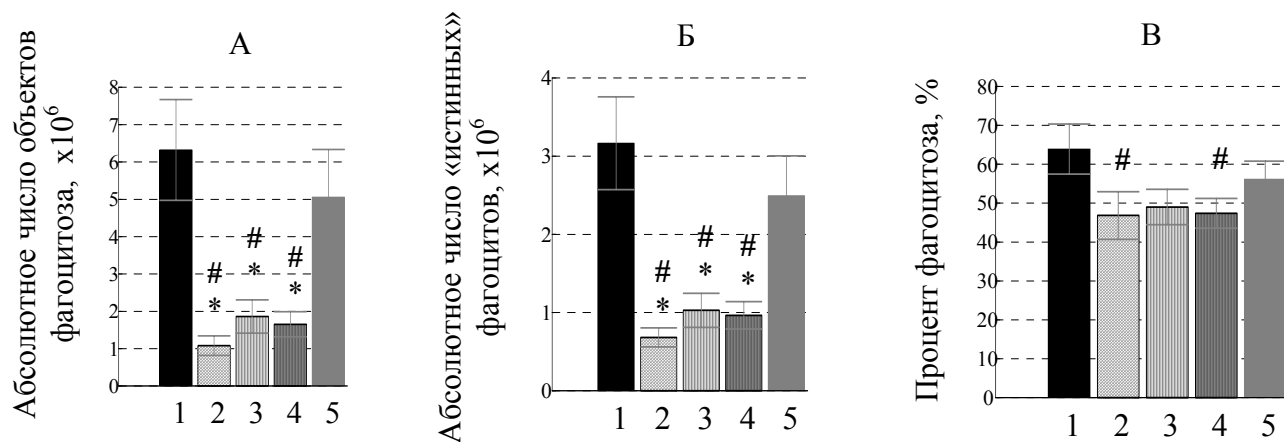
терапией (3-я группа), в сравнении с травмированными крысами (1-я группа). В костном мозге и тимусе стандартная терапия приводит к снижению числа ЯСК ( $p < 0,05$ ) по сравнению с травмированными животными (1-я группа). У крыс, получавших один профеталь и в комбинации со стандартной терапией, выявляется достоверное возрастание количества ЯСК по отношению не только к показателям животных, получавших одну стандартную терапию, но и к крысам 1-й и 5-й (контроль) групп. Профеталь полностью отменяет уменьшение клеточности тимуса, вызванное стандартной терапией (3-я группа в сравнении со 2-й). При введении профеталья достоверно увеличивается клеточность тимуса в сопоставлении с нетравмированными крысами. При исследовании миелограммы у крыс с ПРГ отмечено достоверное повышение числа эозинофилов, лимфоцитов, хотя суммарного изменения клеточности данного органа не было. При введении препаратов стандартной терапии прослеживается депрессия образования клеток в костном мозге относительно травмы ( $p < 0,05$  2-я группа к 1-й): снижение числа эозинофилов, базофилов, лимфоцитов. Профеталь как в монотерапии, так и при комбинации с препаратами стандартной терапии повышал число клеток моноцитарного, нейтрофильного (рис. 1), эозинофильного рядов, количество лимфобластов, лимфоцитов и плазматических клеток, в монотерапии – число клеток эритроидного ряда. Подобные изменения характеризуют данный препарат как средство, активирующее иммунопоэз.

*Изменение фагоцитарной активности клеток регионарного лимфатического узла.* При ПРГ изменений относительных и абсолютных показателей фагоцитоза в регионарном лимфатическом узле не происходит. Препараты стандартной терапии снижают число макрофагов относительно контроля и ПРГ, абсолютные и относительные интегральные показатели суммарной фагоцитарной активности макрофагов. Введение профеталья вызывает депрессию фагоцитарной активности по абсолютным значениям (рис. 2). Подобный эффект связан с уменьшением в регионарном лимфатическом узле количества клеток, обладающих фагоцитарной



**Рис. 1. Влияние травмы, профеталья и стандартной терапии на количество клеток моноцитарного, нейтрофильного рядов, лимфоидных клеток костного мозга.**

*Примечание.* Здесь и на рис.2–5 \* –  $p < 0,05$  к контролю (5-й группе); # –  $p < 0,05$  к 1-й группе; а –  $p < 0,05$  ко 2-й группе. По оси абсцисс – группы животных: 1 – ПРГ, 2 – ПРГ+стандартная терапия, 3 – ПРГ+ стандартная терапия+профеталь, 4 – ПРГ+профеталь, 5 – контроль. По оси ординат – число ЯСК  $\times 10^6$  / костный мозг бедренной кости.

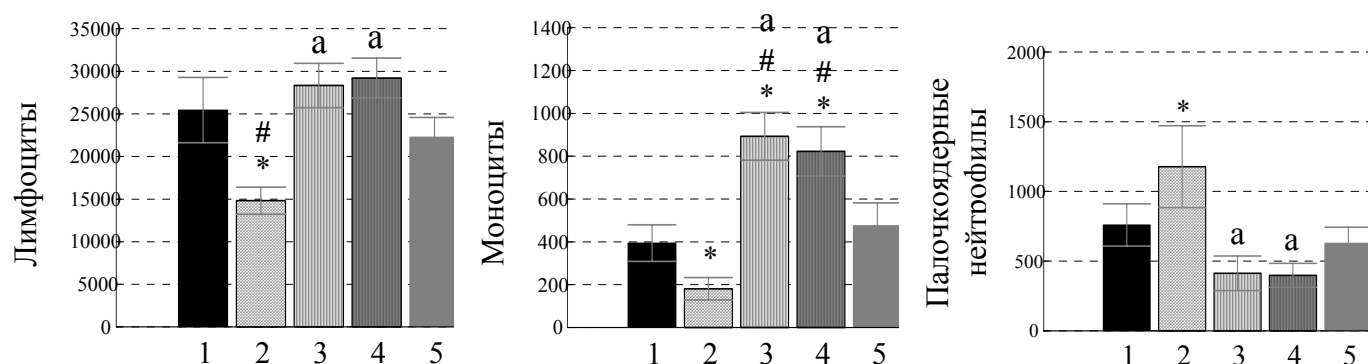


**Рис. 2. Влияние травмы, профеталья и стандартной терапии на показатели суммарной фагоцитарной активности клеток регионарного лимфатического узла.**

*Примечание.* По оси ординат на А и Б – абсолютные показатели  $\times 10^6$  / орган.

активностью. Относительно травмы профеталь супрессирует фагоцитоз преимущественно за счет снижения количества макрофагов с низкой и средней фагоцитарной активностью (захвативших 1 – 4 объекта).

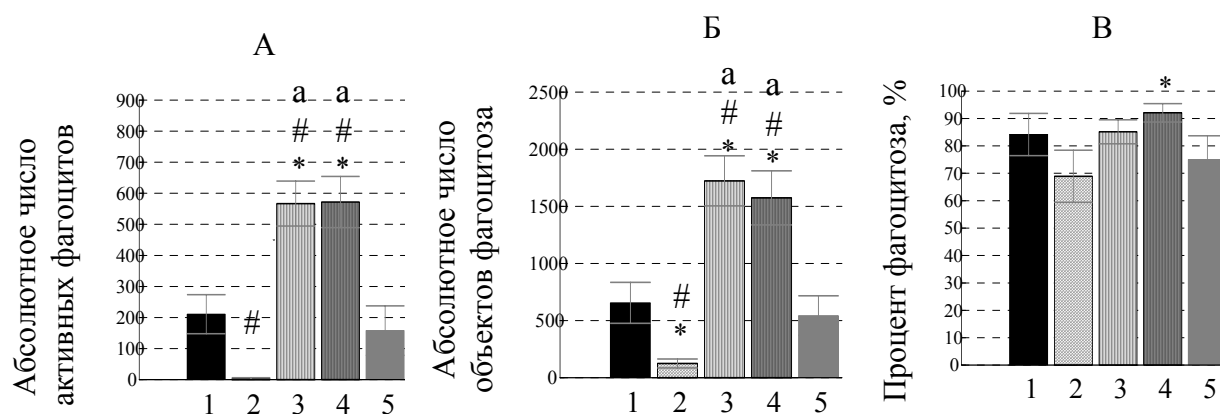
*Изменение количественного состава и фагоцитарной активности лейкоцитов периферической крови.* В поздний травматический период (14-е сутки) у крыс с ПРГ выявляется активация поглотительной способности моноцитов периферической крови. Препараты стандартной терапии вызывают развитие моноцитопении, лимфопении, увеличение числа молодых форм нейтрофилов (рис. 3). Изменение фагоцитарной активности клеток проявляется в активации нейтрофильного фагоцитоза, депрессии фагоцитарной активности моноцитов и эозинофилов. При введении профетала в периферической крови обнаружены моноцитоз, активация фагоцитарной активности моноцитов (процент фагоцитоза) (рис. 4), повышение их вклада в суммарный фагоцитоз, отмена действия препаратов стандартной терапии: возрастание абсолютного количества лимфоцитов, снижение уровня палочкоядерных нейтрофилов и их фагоцитарной активности в сравнении с крысами 2-й группы.



**Рис. 3. Влияние травмы, профетала и стандартной терапии на абсолютные показатели количественного состава лейкоцитов периферической крови.**

*Примечание.* По оси ординат – число лейкоцитов в 1 мкл крови.

*Изменение показателей фагоцитарной активности перитонеальных клеток.* При ПРГ изменений относительных и абсолютных показателей фагоцитоза клеток брюшной полости не происходит. Препараты стандартной терапии значительно снижают количество мононуклеарных фагоцитов, фагоцитарную активность данного пула клеток, фагоцитарную активность нейтрофильных гранулоцитов, тучных клеток.

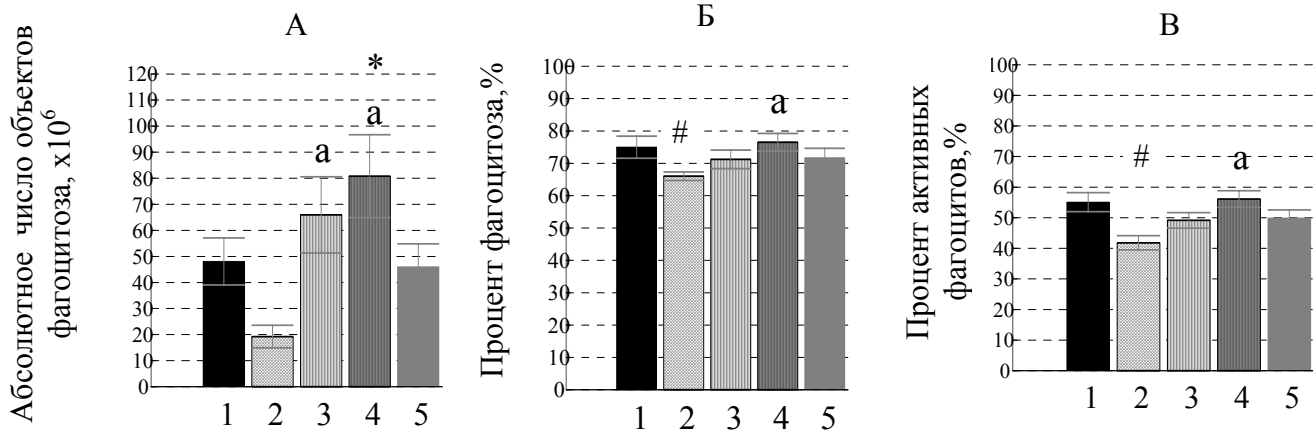


**Рис. 4. Влияние травмы, профетала и стандартной терапии на показатели суммарной фагоцитарной активности моноцитов периферической крови.**

*Примечание.* По оси ординат на А и Б – абсолютные показатели на 1 мкл крови.

Профеталь уменьшает количество лимфоцитов, повышает фагоцитарную активность мононуклеарных фагоцитов (рис. 5), тучных клеток, уменьшает показатели фагоцитарной активности перитонеальных гранулоцитов. При этом выявляются отмена депрессивного действия глюкокортикоидов в составе стандартной терапии на количество мононуклеарных фагоцитов, изменение направленности фагоцитарной активности данного типа клеток, более выраженное супрессивное действие на фагоцитарную активность нейтрофильных гранулоцитов, чем при монотерапии профеталем.

Полученные результаты указывают на разное влияние профетала на фагоцитарную активность моноцитов периферической крови и их потомков – перитонеальных мононуклеарных фагоцитов и фагоцитирующих клеток регионарного лимфатического узла. Это, по-видимому, объясняется изменением активации клеток системы мононуклеарных фагоцитов и направленностью их дифференцировки, которые во многом определяются природой активирующих сигналов и цитокиновым



**Рис. 5. Влияние травмы, профетала и стандартной терапии на показатели суммарной фагоцитарной активности перитонеальных мононуклеарных фагоцитов.**

*Примечание.* По оси ординат на А – абсолютное число объектов фагоцитоза  $\times 10^6$  / брюшная полость.

микроокружением [Geissmann F. и др., 2003; Rotta G. et al., 2003; Rhen T., Cidlowski J., 2005].

## **2. Влияние профетала на наличие антител к аутоантигенам тканей глаза и уровень альфа-фетопротеина в периферической крови экспериментальных животных**

*Влияние профетала на наличие антител к аутоантигенам тканей глаза.* У интактных животных в плазме крови АТ к аутоантигенам тканей глаза не выявляются. У крыс с ПРГ частота обнаружения АТ к корнеальному белку ВСР-54,  $\alpha$ -кристаллину хрусталика и ретинальному S-антигену составляет для каждого из антигенов 30%. Положительные результаты на наличие АТ одновременно ко всем трем антигенам обнаружены только у 20% животных; к одному антигену АТ определялись у 50% животных, последнее достоверно отличается от контроля ( $p=0,001$ ). Эти факты могут свидетельствовать о формировании аутоенсибилизации и являться прогностически неблагоприятными [Слепова О.С., 1991]. В группе животных, получавших препараты стандартной терапии, появление АТ к ретинальному S-антигену отмечено в 30% случаев, к  $\alpha$ -кристаллину – в 20% и к корнеальному белку ВСР-54 – в 20%.



Положительные результаты на наличие АТ одновременно ко всем трем антигенам определились только у 10% животных; к одному антигену АТ определились у 50% животных, последнее достоверно отличается от контроля ( $p=0,001$ ).

Введение профетала как в варианте монотерапии, так и в комплексе со стандартной терапией приводит к снижению интенсивности аутосенсibilизации, что ведет к исчезновению достоверных отличий от контроля. Так, при монотерапии профеталем в течение 29 суток у 10% травмированных крыс обнаружены АТ против корнеального белка ВСП-54, у 10% – против S-антигена и у 20% – против  $\alpha$ -кристаллина хрусталика. Обнаружение АТ к одному антигену у 20% животных, что достоверно не отличается от контроля, а также отсутствие АТ одновременно ко всем антигенам является положительным результатом. При введении и профетала, и препаратов стандартной терапии в течение 13 суток только у 20% животных выявлены АТ к ВСП-54, у 20% – к  $\alpha$ -кристаллину и у 10% – к S-антигену. Общее число животных с положительными реакциями на обнаружение АТ к одному антигену на 30 сутки эксперимента составило 30% ( $p>0,05$  к 6-й группе). Наиболее эффективно совместное введение профетала в течение 29 суток и препаратов стандартной терапии. В этом случае АТ против корнеального белка ВСП-54 выявлялись у 20% крыс, против  $\alpha$ -кристаллина – у 10%; АТ против S-антигена не определялись, АТ к одному антигену – у 30% ( $p>0,05$  к 6-й группе). Одновременно ко всем антигенам АТ не найдены ни в одном случае, как и у интактных животных.

При исследовании статистической связи между наличием АТ в периферической крови к антигенам тканей глаза и схемой проводимой терапии при ПРГ применен критерий  $\chi^2$ . Установлено, что расчетное значение  $\chi^2_{p=}$  23,439 (сумма расчетных элементов), табличное значение  $\chi^2_{т}$  = 18,307. Так как  $\chi^2_{p} > \chi^2_{т}$ , то анализируемые признаки статистически зависимы при уровне значимости, равной 0,05. Результаты демонстрируют зависимость между разными схемами применения профетала при ПРГ и наличием в периферической крови антител к антигенам тканей глаза (корнеальному

протеину ВСР-54,  $\alpha$ -кристаллину хрусталика и S-антигену сетчатки). Существенным представляется факт максимального защитного эффекта в отношении формирования иммунного ответа к S-антигену сетчатки – наиболее «увеитогенному» белку глаза.

*Уровень альфа-фетопротейна в периферической крови.* Средняя концентрация АФП через 24 ч после 30-й инъекции профетала в дозе 1мкг/кг составила 4,677 мкг/мл ( $p=0,000053$  к 6-й группе). При введении профетала в комбинации с препаратами стандартной терапии средняя концентрация АФП через 24 ч после 30-й инъекции профетала составила 2,883 мкг/мл ( $p=0,000204$  к 6-й группе,  $p=0,010266$  к 4-й), через 2 недели после 14-й инъекции профетала – 2,499 мкг/мл ( $p=0,000682$  к 6-й группе,  $p=0,003135$  к 4-й). В условиях введения профетала в комплексе со стандартной терапией уровень АФП примерно в 1,6 раза ниже, чем в варианте монотерапии. Это может быть частично связано с действием дексаметазона, который, как и другие глюкокортикоиды, обладает мощным катаболическим эффектом [Gruneich J., Diamond S., 2007; Holland W., Brozinick J. et al., 2007]. Сохранение повышенного уровня концентрации АФП в течение 2 недель после прекращения введения профетала (5-я группа) косвенно указывает на депонирование белка в организме и эффект материальной кумуляции, что важно для поддержания иммуномодулирующего действия препарата в условиях терапии.

### **3. Патоморфологическая характеристика травматического воспаления глаза и влияние профетала на процессы регенерации при экспериментальном проникающем ранении глаза**

При гистологическом исследовании глаз на 14-е сутки после ПРГ у животных без лечения, а также получавших стандартную противовоспалительную и антибактериальную терапию, наблюдается восстановление тканевого дефекта через реализацию «аварийного» механизма рубцевания, документированного гистологическими и морфометрическими методами исследований. У животных, которым проводилась стандартная терапия, ответом на повреждение является

достоверное увеличение количества дифференцированных функционально активных фибробластов по сравнению с группой без лечения. Формируется рубцовая ткань на фоне умеренного экссудативного воспаления.

При введении животным одного профетала и его комбинации с препаратами стандартной терапии замедляется формирование грубой рубцовой ткани с повышением митотической активности МПЭ ( $p < 0,05$  к 1-й и 2-й группам), приводящей к ранней эпителизации зоны повреждения; определяется снижение интенсивности процессов образования коллагеновых и эластических волокон, о чем свидетельствует уменьшение их плотности в рубце ( $p < 0,05$  к 1-й и 2-й группам). У животных, получавших только профеталь, снижение интенсивности процессов фибриллообразования происходит на фоне более выраженного экссудативного воспаления. Полученные данные свидетельствуют, что профеталь как в варианте монотерапии, так и в составе комплексного лечения, стимулируя пролиферативную активность клеток МПЭ, приводит к ранней эпителизации зоны повреждения, одновременно замедляет процессы фибриллообразования, что блокирует развитие грубого рубца и индуцирует процессы восстановления тканевых дефектов.

Таким образом, проведенные исследования существенно расширяют и дополняют представления о роли иммунной системы в патогенезе ПРГ и механизме действия профетала в условиях индуцированного изменения функций иммунной системы при данном виде патологии (рис. 6).

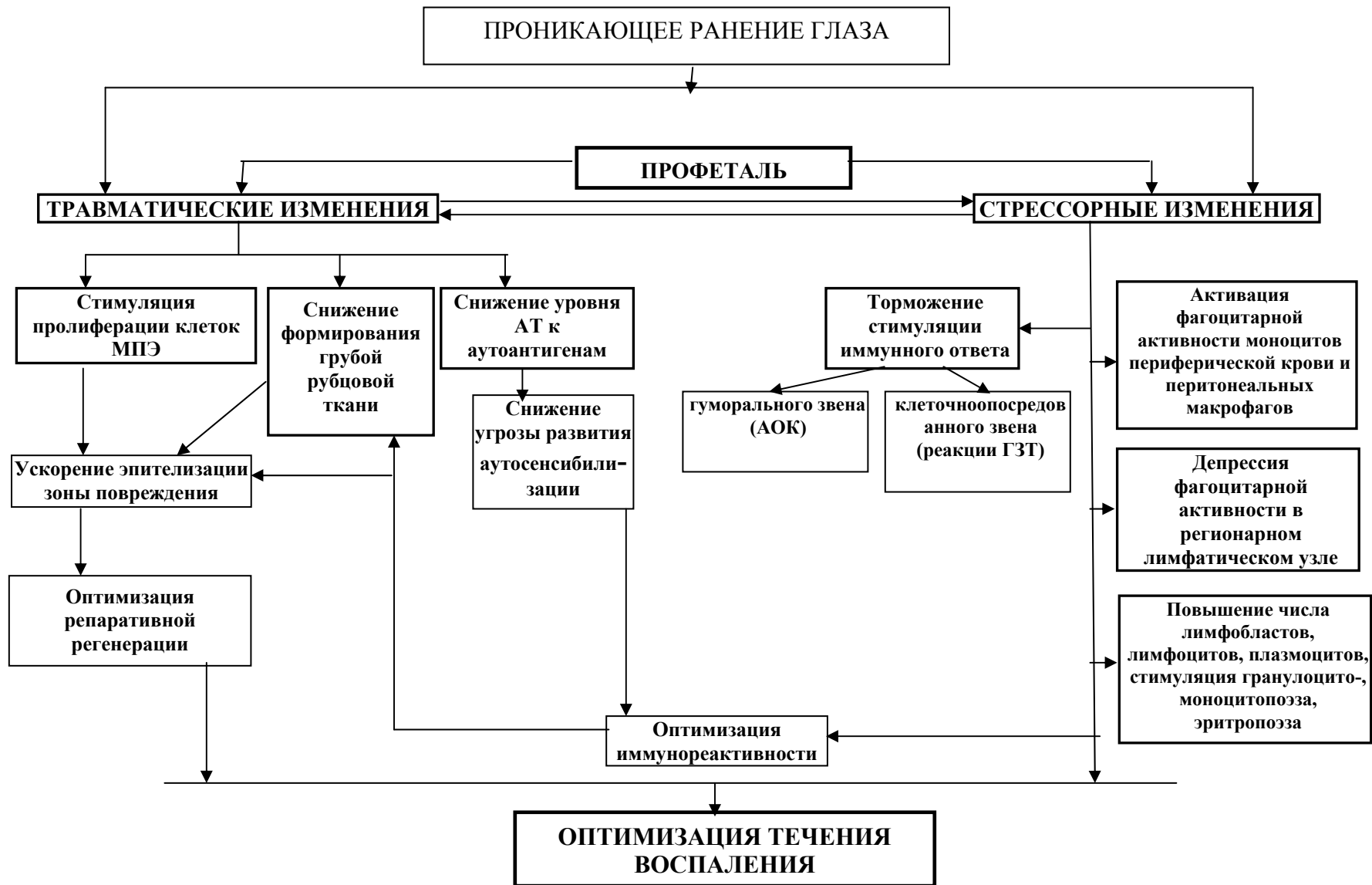


Рис. 6. Механизм действия профетала в патогенетической терапии проникающего ранения глаза.

## ВЫВОДЫ

1. Проникающее ранение глаза вызывает ряд изменений иммунной системы, включая развитие аутоиммунного ответа к тканям глаза, усиление выраженности локального клеточноопосредованного и гуморального иммунного ответа на ксеноантиген, фагоцитарной активности моноцитов периферической крови, повышение количества эозинофилов и лимфоцитов в костном мозге на фоне восстановления дефекта повреждения через рубцевание.

2. Применение стандартной терапии не снижает вероятность развития аутоиммунных реакций, одновременно приводит к угнетению клеточноопосредованного и гуморального иммунного ответа, уменьшению числа эозинофилов и базофилов в костном мозге, активации нейтрофильного и угнетению макрофагального фагоцитоза при сохранении выраженности воспалительной инфильтрации и фиброзных изменений в поврежденной ткани.

3. Применение при проникающем ранении глаза одного профетала отменяет стимуляцию антителообразования и уменьшает степень выраженности реакции ГЗТ; при комплексной терапии сохраняются эффекты, вызванные препаратами стандартной терапии.

4. Профеталь повышает количество лимфоцитов, гранулоцитов, моноцитов и эритроцитов в костном мозге как при монотерапии, так и в комплексе с препаратами стандартной терапии, отменяет супрессивное действие последних на общую клеточность костного мозга и тимуса.

5. Применение одного профетала и его комбинации со стандартной терапией оказывает разнонаправленное действие на функцию фагоцитов: повышает фагоцитарную активность моноцитов, макрофагов, мастоцитов; не влияет на поглотительную способность нейтрофилов и эозинофилов крови; снижает поглотительную активность фагоцитов реагирующего лимфатического узла и перитонеальных гранулоцитов.

6. Введение одного профеталя и его комбинации с препаратами стандартной терапии снижает частоту выявления антител в плазме крови травмированных животных к аутоантигенам тканей глаза: ретинальному S-антигену,  $\alpha$ -кристаллину и белку роговицы ВСП-54, при максимальном защитном эффекте по отношению к S-антигену – наиболее «увеитогенному» белку глаза. При введении профеталя с препаратами стандартной терапии уровень альфа-фетопротеина в плазме крови ниже, чем в варианте монотерапии, что указывает на необходимость учета их взаимодействия.

7. Введение одного профеталя, как и совместно с препаратами стандартной терапии, индуцирует репаративную регенерацию, замедляя раннее формирование грубой рубцовой ткани, ускоряет эпителизацию зоны повреждения.

## **Список работ, опубликованных по теме диссертации**

### **Публикации в научных изданиях, рекомендованных ВАК РФ**

1. Гаврилова Т.В. Иммунокоррекция при проникающем ранении глаза в эксперименте / Т.В. Гаврилова, В.А. Черешнев, Р.Р. Файзрахманов и др. // Вестник Уральской медицинской академической науки. – 2005. – № 4. – С. 5-7.

2. Гаврилова Т.В. Особенности морфофункционального состояния структур глаза при различных схемах терапии проникающего ранения с включением профеталя / Т.В. Гаврилова, Р.Р. Файзрахманов, М.В. Черешнева и др. // Вестник Уральской медицинской академической науки. – 2006. – № 1. – С. 40 – 45.

3. Файзрахманов Р.Р. Иммуномодулирующее действие профеталя в экспериментальной модели проникающего ранения глаза / Р.Р. Файзрахманов, Т.В. Гаврилова, М.В. Черешнева и др. // Вестник Уральской медицинской академической науки. – 2006. – № 3(1). – С. 251 – 253.

4. Гаврилова Т.В. Иммуномодулирующие эффекты профеталя в модели локального иммунного ответа к эритроцитам барана при проникающем ранении глаза

крыс / Т.В. Гаврилова, Р.Р. Файзрахманов, М.В. Черешнева и др. // Медицинская иммунология. – 2006. – Т. 8. – № 2-3. – С. 128 – 129.

### **Публикации в других изданиях**

5. Черешнев В.А. Отечественные иммуномодуляторы в коррекции стрессорных нарушений функций иммунной системы при проникающем ранении глаза / В.А. Черешнев, Т.В. Гаврилова, Р.Р. Файзрахманов и др. // Иммунология вчера, сегодня, завтра: Сб. науч. тр. – Пермь. – 2005. – С. 14 – 20.

6. Гаврилова Т.В. Зависимость направленности изменения иммунного ответа при экспериментальном проникающем ранении глаза от срока травматического повреждения / Т.В. Гаврилова, Н.Л. Беркасова, Р.Р. Файзрахманов и др. // Иммунология вчера, сегодня, завтра: Сб. науч. тр. – Пермь. – 2005. – С. 20 – 28.

7. Гаврилова Т.В. Влияние профетала на выраженность реакции ГЗТ и гуморальный иммунитет при экспериментальном проникающем ранении глаза / Т.В. Гаврилова, Р.Р. Файзрахманов, М.В. Черешнева и др. // Проблемы загрязнения окружающей среды (ICER-2005): Тез. докл. VI Междунар. конф. – Пермь. – 2005. – С. 61 – 61.

8. Черешнев В.А. Стрессорные и травматические нарушения функций иммунной системы и их коррекция / В.А. Черешнев, Т.В. Гаврилова, Р.Р. Файзрахманов и др. // Проблемы загрязнения окружающей среды (ICER-2005): Тез. докл. VI Междунар. конф. – Пермь. – 2005. – С. 106 – 106.

9. Черешнев В.А. Отечественные иммуномодуляторы в коррекции стрессорных и травматических нарушений функций иммунной системы / В.А. Черешнев, Т.В. Гаврилова, Р.Р. Файзрахманов и др. // От экспериментальной биологии к превентивной и интегративной медицины: Сб. тр. Междунар. междисциплинарного симп. – Новосибирск. – 2005. – С. 72 – 73.

10. Гаврилова Т.В. Оценка иммуномодулирующего действия профетала при экспериментальном проникающем ранении глаза / Т.В. Гаврилова, Р.Р. Файзрахманов,

М.В. Черешнева и др. // Матер. IV Евро-Азиатской конф. по офтальмохирургии. – Екатеринбург. – 2006. – С. 114 – 115.

11. Гаврилова Т.В. Исследование зависимости изменения уровня иммунного ответа от срока травматического повреждения при экспериментальном проникающем ранении глаза / Т.В. Гаврилова, Н.Л. Беркасова, Р.Р. Файзрахманов // Биология – наука XXI века: Тез. докл. X Междунар. Пущинской школы-конф. молодых ученых. – Пущино. – 2006. – С. 128 – 128.

12. Гаврилова Т.В. Иммуномодулирующее действие профетала при локальном иммунном ответе в экспериментальной модели проникающего ранения глаза / Т.В. Гаврилова, Р.Р. Файзрахманов, М.В. Черешнева и др. // Матер. V Конф. иммунологов Урала. – Иммунология Урала. – 2006. – №1 (5). – С. 5 – 6.

13. Гаврилова Т.В. Влияние альфа-фетопротеина на гуморальное и клеточноопосредованное звенья иммунитета при проникающем ранении глаза в эксперименте / Т.В. Гаврилова, Р.Р. Файзрахманов, М.В. Черешнева и др. // Матер. VI Всероссийской школы офтальмолога. – 2007. – С.257 – 262.

### **Список основных сокращений**

АТ	- аутоантитела
АФП	- альфа- фетопротеин
АОК	- антителообразующая клетка
ГЗТ	- гиперчувствительность замедленного типа
ИФА	- иммуноферментный анализ
ОП	- оптическая плотность среды
ПРГ	- проникающее ранение глаза
ЯСК	- ядродержащие клетки
BCP-54	- β-корнеальный протеин (β-corneal protein)
CD	- кластер дифференцировки (cluster of differentiation)
NK	- нормальные киллеры (normal killer)



ФАЙЗРАХМАНОВ

Ринат Рустамович

**ОЦЕНКА ИММУНОМОДУЛИРУЮЩЕГО ДЕЙСТВИЯ  
ПРОФЕТАЛЯ ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ ПРОНИКАЮЩЕМ  
РАНЕНИИ ГЛАЗА**

14.00.36- аллергология и иммунология

Автореферат на соискание ученой степени  
кандидата медицинских наук

Екатеринбург – 2007

---

Подписано в печать 04.04.07 г. Формат 60x84 1/16 Усл. печ. л. 1,4. Тираж 100 экз. Заказ № 98

Размножено с готового оригинал – макета в типографии  
“Уральский центр академического обслуживания”.  
620219, г. Екатеринбург, ул. Первомайская, 91.