

РЕГУЛЯЦИЯ ВОСПАЛЕНИЯ И ИММУНИТЕТА

Characterization of a putative human immunoregulatory protein: the role of Tj6 an [H⁺]-ATPase-like protein in lymphocyte activation

Y. Babichev, A. Tamir, N. Isakov

Department of Microbiology and Immunology, Ben-Gurion; University of the Negev, Beer Sheva, Israel

Physiological stimulation of resting T lymphocytes occurs following antigen-specific T cell receptor (TCR) interaction with a peptide antigen. Signals derived from conformational changes in the TCR are transduced into the nucleus via a series of ATP-dependent biochemical events operating in a cascade. Studies about the mitochondria role in T lymphocyte activation can contribute to our understanding and ability to regulate T cell activation. Several factors that may be involved in immune regulation have been reported, including a murine protein termed mTJ6. In vitro studies with a partially purified mTJ6 revealed that the factor is capable of inhibiting T cell proliferation in response to mitogens or allogeneic lymphocytes. In order to study the human homologue of mTJ6, we used a HL 60-derived cDNA library in an attempt to identify and characterize the gene for the human TJ6 (hTJ6). Cloning and sequencing hTJ6 revealed that the gene encodes a 98kDa protein with a predicted amino acid sequence which is highly homologous to mTJ6 and to several members of ATP-dependent proton pumps family that are responsible for acidification of intracellular compartments in eukaryotic cells. hTJ6 displays 6 or 7 transmembrane domains and it is expressed in a wide range of cell types and tissues. hTJ6 localization to the cell membrane as well as in the intracellular compartment was confirmed by confocal microscopy in Jurkat cells, using TJ6-specific Abs that were raised in rabbit. Therefore I will be concentrate in identifying the role of TJ6 and/or other ATP-ase pump-like proteins activities in the mitochondria after lymphocyte activation. Further studies will aim at the characterization of the biological activity of hTJ6 and the potential mechanism by which it may affect immune response.

IL-18 binding protein expression by endothelial cells and macrophages is up-regulated during active Crohn's disease

A. Corbaz¹, T. ten Hove², S. Herren¹, P. Graber¹, B. Schwartsburd³, I. Belzer³, J. Harrison¹, T. Plitz³, M.H. Kosco-Vilbois¹, S.-H. Kim⁴, C.A. Dinarello⁴, D. Novick⁵, S. van Deventer², Y. Chvatchko¹

¹Department of Experimental Biology and Pharmacology, Sero Pharmaceutical Research Institute, Geneva, Switzerland; ²Laboratory of Experimental Internal Medicine, Academic Medical Center, Amsterdam, The Netherlands; ³InterPharma Laboratories, Nes Ziona, Israel; ⁴Division of Infectious Diseases, University of Colorado Health Sciences Center, Denver, Colorado 80262 USA; ⁵Department of Molecular Genetics, The Weizmann Institute of Science, Rehovot, Israel

The pathogenesis of Crohn's Disease (CD) remains under intense investigation. Increasing evidence suggests a role for mature IL-18 in the induction of pro-inflammatory cytokines and Th-1 polarization in CD lesions. The aim of the present study was to investigate the contribution of the IL-18-neutralising (a and c) and non-neutralising (b and d) isoforms of IL-18-binding protein (IL-18BP) during active CD. Intestinal endothelial cells and macroph-

ages were the major source of IL-18BP within the submucosa, and this IL-18BP production was also found to be relevant to other types of endothelial cells (HUVEC) and macrophages (peripheral monocytes). IL-18BP messenger transcript and protein were significantly increased in surgically resected specimens from active CD compared to control patients correlating with an up-regulation of IL-18. Analysis of the expression of the four IL-18BP isoforms as well as being free or bound to IL-18 was reported and revealed that unbound IL-18BP isoforms a, c and inactive isoform d were present in specimens from active CD and control patients while isoform b was not detected. IL-18/IL-18BP complex was also detected. Interestingly, although most was complexed, free mature IL-18 could still be detected in active CD specimens even in the presence of the IL-18BP isoform a/c. These results demonstrate that the appropriate neutralizing isoforms are present in the intestinal tissue of patients with active CD and highlights the complexity of IL-18/IL-18BP biology.

Interleukin (IL)-18/IL-18 binding protein signalling modulates atherosclerotic lesion development and stability

A. Corbaz², Z. Mallat¹, A. Scoazec¹, P. Graber², S. Alouani², B. Esposito¹, T. Humbert², P. Henry³, A. Tedgui¹, Y. Chvatchko²

¹Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, Unité 541, et Institut Fédératif de Recherche Paris VII, Hôpital Lariboisière, 41, Bd de la Chapelle, 75475 Paris cedex 10, France; ²Serono Pharmaceutical Research Institute, 1228 Plan-Les-Quates., Geneva, Switzerland; ³Service de Cardiologie, Hôpital Lariboisière, rue Ambroise Paré, 75010 Paris, France.

Atherosclerosis is the leading cause of mortality in industrialised countries and carries an important socio-economic burden. Unabated inflammatory mechanisms are responsible for changes in atherosclerotic plaque composition leading to plaque disruption and to the occurrence of acute ischemic syndromes, namely, myocardial infarction and stroke. Interleukin (IL)-18 is an inducer of IFN γ with potent activities on inflammatory and vascular cells and is thought to contribute to the pathogenesis of chronic immunoinflammatory processes. We have recently detected increased production of IL-18 by macrophages and smooth muscle cells in unstable human atherosclerotic plaques that were responsible for strokes compared with stable plaques from asymptomatic patients. We now extend these findings and show increased levels of IL-18 ($p < 0,05$) in the circulating blood of patients with acute ischemic coronary syndromes (unstable angina and myocardial infarction, 30 males, 18 females, mean age $66,2 \pm 1,8$ years old, of whom 14 had unstable angina and 34 had myocardial infarction; IL-18 levels: $146,9 \pm 17,1$ pg ml⁻¹) compared with non-ischemic patients (10 males, 3 females, mean age $60,0 \pm 5,2$ years old; IL-18 levels: $73,0 \pm 12,2$ pg ml⁻¹). Taken together, these results obtained in humans suggest a potential role for IL-18 in plaque destabilisation. An endogenous IL-18 binding protein (IL-18BP) that neutralises IL-18 has been identified. However, the role of IL-18BP in the modulation of atherogenesis and other chronic immunoinflammatory diseases *in vivo* is currently unknown. In this study, we show that *in vivo* electrotransfer of an expression plasmid DNA encoding for murine IL-18BP prevents fatty streak development

in the thoracic aorta of apoE knockout mice (69 % reduction in lesion size, $p < 0,0001$) and slows progression of advanced atherosclerotic plaques in the aortic sinus (24 % reduction in lesion size, $p < 0,01$). More importantly, transfection with the IL-18BP plasmid induces profound changes ($p < 0,001$) in plaque composition (decrease in macrophage, T cell, cell death and lipid content and increase in smooth muscle cell and collagen content) leading to a stable plaque phenotype. These results identify for the first time a critical role for IL-18/IL-18BP regulation in atherosclerosis and suggest a potential role for IL-18 inhibitors in reduction of plaque development/progression and promotion of plaque stability.

Lipopolysaccharide induces normal human term placenta to secrete high levels of TNF α and IL-6

G. Holcberg¹, M. Huleihel², O. Sapir¹, S. Levi², M. Katz¹, L. Myatt³, M. Mazor¹

¹Department of Obstetrics and Gynecology, Soroka University Medical Center;

²Department of Microbiology & Immunology, Faculty of Health Sciences, Ben Gurion University of the Negev, Israel; ³University of Cincinnati, College of Medicine, Cincinnati, OH, USA

Objective. To examine the stimulatory effect of lipopolysaccharide (LPS) on IL-6 and TNF α secretion in the isolated cotyledons of human term placentas.

Study design. Isolated placental cotyledons were dually perfused in 5 normal term placentas obtained after birth. LPS (100 ng/kg) was perfused into the maternal site during 10 hours. Perfusate samples from fetal and maternal sites were collected every 30 min. The perfusates were examined by ELISA for IL-6 and TNF α levels. Statistical significance was determined by paired t test and ANOVA.

Results. A significant increase in IL-6 and TNF α concentrations was observed within 8–10 hours of perfusion in maternal and fetal circulation in term placentas perfused with either or without LPS. The increase of TNF α and IL-6 in perfusate was time course dependent. The TNF α and IL-6 levels were significantly higher in maternal compartment after exposure to LPS as compared to control placentas (from 421 ± 217 pg/ml to 560 ± 202 pg/ml, $p < 0,05$ and from 971 ± 390 pg/ml to 2136 ± 688 pg/ml respectively, $p < 0,05$). The same pattern of LPS stimulation of TNF α and IL-6 was shown in the fetal compartment of the term placentas (from 20 ± 9 pg/ml to 53 ± 15 pg/ml, $p < 0,05$ and from 90 ± 39 pg/ml to 388 ± 154 pg/ml, $p < 0,05$ respectively).

Conclusions. In normal human placentas the elevation of TNF α and IL-6 is time course dependent and increases after 10 hours of perfusion. LPS had significant increased the capacity of term placentas to secrete TNF α and IL-6. Thus, LPS may affect parturition by mechanisms that involve the regulation of cytokine production.

Elevation of TNF α and IL-6 levels in preterm human placenta compared to term placenta

M. Huleihel¹, G. Holcberg², O. Sapir², S. Levi¹, M. Katz², L. Myatt³, M. Mazor¹

¹Department of Microbiology and Immunology; ²Department of Obstetrics and Gynecology, Soroka University Medical Center, Faculty of Health Sciences, Ben-Gurion University of the Negev, Beer-Sheva, Israel; ³University of Cincinnati, College of Medicine, Cincinnati, OH, USA

Aim of the study. To determine the concentrations of TNF α and IL6 in the perfusate of isolated human placental cotyledon from term and preterm deliveries.

Study design. Isolated placental cotyledons were dually perfused in 5 term placentas and 4 placentas obtained after preterm birth (28–34 W of gestation). Perfusate samples from fetal and maternal sites were collected every 30 min (for 10 hours) and were examined by ELISA for IL-6 and TNF α levels. Statistical analysis was performed by ANOVA and paired t test.

Results. A significant increase of TNF α and IL-6 concentrations was observed in perfusate of maternal and fetal circulation in term and preterm placentas during 10 hours of perfusion. The increase of these cytokines in perfusate was time course dependent. The TNF α levels were significantly higher in maternal compartment in both groups (421 ± 217 and 522 ± 179 pg/ml respectively) as compared to fetal compartment (20 ± 9 and 65 ± 25 pg/ml respec-

tively, $p < 0,05$). Moreover the TNF α levels were significantly higher in perfusate of preterm placentas in maternal and fetal compartments (522 ± 179 and 65 ± 25 pg/ml respectively) as compared to term placentas (20 ± 9 and 421 ± 217 pg/ml respectively, $p < 0,05$) after 10 hours of perfusion. The IL-6 levels were significantly higher in preterm placentas as compared to term placentas in maternal and fetal compartments (1945 ± 688 pg/ml and 971 ± 390 pg/ml in maternal compartment respectively, and 419 ± 154 pg/ml and 90 ± 39 pg/ml in fetal compartment respectively $p < 0,05$).

Conclusions. Perfusate of maternal sites from term and preterm placentas show higher levels of TNF α and IL-6 than of the fetal sites. Perfusates of preterm placentas shows higher levels of TNF α and IL-6 than term placentas. Our results may indicate the involvement of these cytokines in the process of the preterm parturition.

Distinct expression of pro-inflammatory cytokines and their modulators (IL-1Ra and IL-10) in testicular tissue cells of fertile and infertile men

M. Huleihel¹, E. Lunenfeld², V. Dyomin³, N. Vardi³, I. Ynai-Inbar³, L. Harosh¹, G. Potashnik²

¹Department of Microbiology and Immunology; ²Department of Obstetrics and Gynecology; ³Pathology Institute, Soroka University Medical Center, Faculty of Health Sciences, Ben-Gurion University of the Negev, Beer-Sheva, Israel

Introduction. Cytokines are produced and involved in the regulation of testicular cell functions.

Our aim: to evaluate the levels of inflammatory cytokines (IL-1 α , IL-1 β , IL-6 and TNF α) and their down-regulators (IL-1Ra and IL-10) in testicular biopsies of fertile and infertile men.

Methods. Biopsies from 6 fertile men, 6 infertile men with incomplete maturation arrest and 6 infertile men with Sertoli only syndrom men were examined by immunohistochemical staining for the expression levels and cellular localization of IL-1 α , IL-1 β , IL-6, TNF α , IL-1Ra and IL-10.

Results see in table.

Conclusions. This is the first report showing expression of immuno-regulatory cytokines in human testicular tissues. IL-1 α , IL-1Ra, IL-6 and TNF α are differently expressed in testicular cells of pathological conditions as compared to normal. The distinct expression of the cytokines in the different testicular cells may indicate their involvement in the function of these cells. The expression of high levels of IL-10 in testicular tissues may suggest its involvement in a general suppression mechanism against autoimmune response against sperm cells in the testicular compartment. The mechanism by which cytokines involved in male fertility is

Table 1

Examined cells		Study group		
		Fertile men	Incomplete maturation arrest	Sertoli syndrom only
IL-1a	L	++	+++	+++
	S	+	±	±
	G	+	+	-
IL-1b	L	++	++	++
	S	+	+	+
	G	+	+	-
IL-1Ra	L	++	±	±
	S	-	-	-
	G	-	-	-
IL-6	L	++	++	++
	S	++	+	+
	G	++	+	-
TNF α	L	+	+	±
	S	+	±	±
	G	±	±	-
IL-10	L	++++	++++	++++
	S	+++	+++	+++
	G	+++	+++	-

L — Leydig cells; S — Sertoli cells; G — Germ cells; (+) intensity of staining.

not yet clear, however our results may indicate that some cytokines may be involved in the regulation of testicular functions, under physiological and pathological conditions, and thus could be involved in male fertility.

IL-1 β as a major activator of angiogenesis

E. Voronov, D. Shuval, E. Cagnano, P. Zarin, R. White, C. Dinarello, R. Apte
Department of Microbiology and Immunology, Ben-Gurion University of the Negev, Beer-Sheva, Israel; Department of Infectious Diseases, University of Colorado Health Science Center, Denver, USA

Tumor growth and metastasis require new blood vessel growth. Angiogenic factors can be generated by both the tumor cells and by cellular elements in the tumor's environment. IL-1 is an ubiquitous mediator at the site of tumor development; it maybe expressed in the tumor's microenvironment by diverse stromal parenchymal and immune cells, and also by the malignant cells. In endothelial cells, recombinant IL-1 was shown to affect proliferation, secretory function and the expression of adhesion molecules; however, IL-1 has not been considered as a major activator of angiogenesis. In our laboratory, *in vivo* function of IL-1 family (IL-1 α , IL-1 β and IL-1Ra) on tumor development was assessed. Preliminary studies have indicated that IL-1 is a major regulator of tumor invasiveness: 1) Tumor cells over-expressing IL-1 β are become more aggressive; 2) Treatment of tumor-bearing mice with the IL-1Ra reduces malignancy patterns; 3) Highly metastatic melanoma cells injected into IL-1 β knockout (KO) mice are impaired to develop tumor; 4) There was no tumor-mediated angiogenesis in IL-1 β KO mice. Thus, IL-1 possibly serves as a major molecule that induces the angiogenic switch in tumors and our attempts will be made to develop treatment protocols, based on the application on the IL-1Ra, to inhibit tumor recurrence and metastasis in tumor-resected mice. Neutralization of a single molecule, i.e. IL-1, may inhibit the generation of the whole cascade of downstream (effector) angiogenic factors.

Моделирование иммунного ответа у детей с тимомегалией I–III степеней

Н.И. Адисцева

Сибирский медицинский университет, Томск

Целью данной работы явилось применение многофакторного анализа и математического моделирования для прогнозирования иммунного ответа на вакцинальные антигены и клинического течения постпрививочного периода, напряженности специфического иммунитета у детей раннего возраста с тимомегалией I–III степеней. Анализ клинико-иммунологических параметров у 250 детей с тимомегалией по 30 иммуно-гормональным тестам в динамике вакцинации АКДС-вакциной (по I схеме с интервалом между прививками 1,5 мес., по II схеме — 1 мес.) позволил выделить интегральные показатели, на основании которых разработаны математические модели иммунного ответа. Математически доказана разнотипность иммунного ответа, различный характер напряженности иммунитета на тимусзависимые и тимуснезависимые вакцинальные антигены.

Разработанная компьютерная программа (КП) дает возможность установить взаимосвязь неблагоприятного преморбидного фона, сочетания его множественных факторов у детей с тимомегалией (антропогенной нагрузки, отягощенности наследственного и акушерского анамнеза, аномалий ФР и НПР, раннего искусственного вскармливания, высокого инфекционного индекса), степени и клинических проявлений тимомегалии, исходного уровня иммуно-гормональной недостаточности с силой индивидуального иммунного ответа и его напряженности на антигены дифтерии, столбняка и коклюша при применении различных схем иммунизации с изменениями наиболее значимых иммуно-гормональных показателей, характером клинического течения вакцинального процесса.

КП позволяет рассчитать и предупредить риск неполноценного иммунного ответа, развитие постпрививочных реакций и осложнений.

Изучение регуляторных функций аллоспецифических цитотоксических Т-лимфоцитов

Т.В. Анфалова, Л.М. Хромых, Д.Б. Казанский
Российский онкологический научный центр РАМН, Москва

В настоящее время известно, что среди Т-клеточной популяции лимфоцитов существуют регуляторные (супрессорные) клетки, действие которых проявляется в ингибировании активности других Т-клеток. Действие супрессорных клеток можно проследить при развитии аутоиммунных заболеваний, аллергиях, трансплантационных вмешательствах, а также при развитии различных иммунодефицитных состояний.

Данная работа посвящена изучению регуляторных функций аллоспецифических цитотоксических Т-лимфоцитов (ЦТЛ). Работу проводили на линиях аллоспецифических ЦТЛ, полученных от иммунных животных и в дальнейшем генерированных *in vitro* путем нескольких стимуляций. Специфическую активность ЦТЛ проверяли по их способности лизировать аллогенные клетки-мишени (макрофаги) по сравнению с сингенным контролем. Уровень специфического лизиса составлял 80–90 %. Было показано, что внесение полученных ЦТЛ в реакцию смешанной культуры лимфоцитов (СКЛ) приводит к резкому подавлению (в 3–10 раз) пролиферативного ответа — независимо от специфичности отвечающих клеток, стимуляторов и ЦТЛ, участвующих в данной реакции. Аналогичный эффект наблюдали в случае неспецифической стимуляции Т-клеток при помощи конканавалина А в реакции бласттрансформации (РБТ). Ингибирующий эффект сохранялся, если регуляторные клетки добавляли в клеточную систему на вторые и даже третьи (в случае СКЛ) сутки. Внесение аллоспецифических ЦТЛ в умеренно пролиферирующие клеточные системы, такие, как ауто-СКЛ или спонтанно пролиферирующие лимфоциты селезенки или лимфатических узлов, не приводило к какому-либо изменению интенсивности пролиферации. Внесение изучаемых ЦТЛ в культуры ряда опухолевых клеточных линий также приводило к угнетению пролиферации этих клеток — независимо от гаплотипа опухоли. Подавление пролиферации происходило только при непосредственном контакте ЦТЛ с клетками-мишенями. Разделение мембраной отвечающих и регуляторных клеток в РБТ приводило к отмене супрессорного эффекта. Подавление пролиферации в реакциях СКЛ и РБТ под влиянием аллоспецифических ЦТЛ не является результатом апоптоза, реализуемого через Fas–FasL или перфорин. Ингибирующий эффект ЦТЛ обнаруживался при внесении их в культуру лимфоцитов мышей MLR/lpr, которые несут мутантную Fas-молекулу на клеточной поверхности. Использование соединений, блокирующих синтез перфорина, также не препятствовало проявлению ингибирующего действия ЦТЛ.

Таким образом, полученные данные свидетельствуют о полифункциональности аллоспецифических ЦТЛ, которые, наряду с выраженным цитолитическим действием, выполняют регуляторные функции.

Роль цитокинов в переключении изотипов антител при иммунном ответе на Т-независимые антигены 2-го типа

Т.К. Борисова, Е.В. Сидорова

НИИ вирусных препаратов РАМН им. О.Г. Анджаридзе, Москва

Большинство «наивных» В-лимфоцитов несет на поверхности IgM и/или IgD. В ходе иммунизации антигеном может происходить изменение класса синтезируемых иммуноглобулинов (Ig) — переключение изотипа Ig с IgM на IgG, IgA и IgE. При иммунном ответе на многие белковые антигены (Т-зависимые антигены) показано участие Т-клеток и их факторов в процессах Ig-переключения. Растворимые полисахариды (Т-независимые антигены 2-го типа, ТН-2) способны индуцировать иммунный ответ без помощи антигенспецифичных Т-хелперов, при этом образуются, в основном, IgM-антитела и очень небольшие количества антител (АТ) других изотипов. Вместе с тем имеется немало данных, свидетельствующих о возможности переключения изотипа АТ при ответе на ТН-2.

Целью данной работы было изучение роли клеточных популяций и факторов в переключении изотипа АТ при иммунном ответе на ТН-2 антигены — ДНФ-фиколл и ДНФ-декстран. Для решения поставленной цели были использованы 2 модельные системы: 1) культура спленоцитов мышей СВА и 2) культура гибридных клеток, продуцирующих ДНФ-специфичные АТ IgM-изотипа. О величине иммунного ответа судили, определяя число антителообразующих клеток методом локального гемолиза в геле. Для удаления из суспензии спленоцитов Т-клеток применяли обработку клеток анти-Thy 1,2 моноклональными АТ в присутствии компонента морской свинки. Изотип АТ и их количество определяли с помощью ИФА. Было изучено влияние кондиционированных сред (супернатант мышшиной тимомы EL-4 и человеческой Т-Т-гибридомы МР6) и рекомбинантных цитокинов (rIL-2 человека, rIL-6 и rIFN γ мыши) на иммунный ответ *in vitro* на ТН-2 антигены и на продукцию анти-ДНФ АТ клетками гибридами.

Добавление супернатантов EL-4 и МР6, а также rIL-6 в культуру спленоцитов мышей приводило к повышению величины иммунного ответа на антигены и появлению IgG1 анти-ДНФ АТ. Аналогичные результаты наблюдали и при иммунизации *in vitro* спленоцитов, лишенных Т-клеток («В-спленоциты»). Присутствие в среде rIL-2 человека не влияло ни на величину ответа, ни на изотип АТ, а добавление IFN γ , напротив, угнетало величину ответа. При добавлении в среду смеси цитокинов (rIL6 + rIFN γ + EL-4-супернатант) в ходе иммунного ответа на ДНФ-фиколл наблюдали переключение изотипа антител на IgG1, IgG2a и IgG3. Полученные результаты свидетельствуют о том, что при иммунном ответе на ТН-2 под действием цитокинов может происходить переключение изотипа АТ. Поскольку использованные в работе факторы могут секретироваться не только Т-лимфоцитами, но и другими клетками (натуральные киллеры, макрофаги, В-лимфоциты), можно предположить, что при иммунном ответе на ТН-2 переключение изотипа Ig происходит под действием факторов, секретлируемых не только Т-лимфоцитами, но и другими клетками. Во 2-й модельной системе — культуре гибридных клеток, продуцирующих IgM, добавление в среду цитокинов приводило к увеличению секреции АТ, но не влияло на их изотип. Это может свидетельствовать о том, что для запуска переключения изотипа Ig недостаточно одних цитокинов, необходимы дополнительные сигналы, получаемые, возможно, при клеточных контактах В-лимфоцитов.

Синтез цитокинов, индуцированный специфическими аллергенами

Л.Г. Борткевич, Т.Н. Суковаты, Т.А. Сапунова, О.Л. Пашкова, Н.А. Бадыгина, З.В. Лавор, О.М. Ниничук, О.А. Рыбальченко, С.Д. Панасевич

Общественная организация «Белорусский Зеленый Крест», Минск

Цитокины выполняют важнейшие регуляторные функции на начальных этапах индукции и дифференцировки иммуноцитов при формировании специфического аллергического ответа. Также цитокины с провоспалительным эффектом, наряду с гистамином и гистаминоподобными медиаторами, осуществляют эффекторные функции в реализации аллергического повреждения по типу атопии или непосредственно формируют ГЗТ-воспалительный процесс.

Цель настоящего исследования заключалась в изучении *in vitro* возможности индукции синтеза IL-4, γ -интерферона (IFN) и фактора некроза опухолей α (TNF α) в ответ на аллерген-специфический стимул. Обследовано 97 больных атопическим дерматитом (АД), бронхиальной астмой (БА) и разными формами пищевой аллергии (ПА) с 40 аллергенами. Концентрацию цитокинов в супернатантах активированных иммуноцитов периферической крови определяли в ИФА с наборами фирмы Immunotec и НИИ ГиПК МЗ РБ. Степень синтеза TNF α варьировала для больных с различными диагнозами и зависела от активизирующего аллергена. У больных БА концентрация цитокина в ответ на интактный аллерген не превышала 30 пг/мл. Максимальный TNF-ответ регистрировали на этиотропные аллергены: бытовые (422,9 \pm 26,7 пг/мл) и на ряд пищевых аллергенов

(250,1 \pm 12,6 пг/мл), — причем он оставался минимальным при воздействии инфекционных аллергенов. Для больных АД более выраженная реакция лимфоцитов обнаружена в ответ на эпидермальные аллергены. Кроме того, высоким индуцирующим эффектом обладали аллергены из апельсина, пшеничной муки и мяса курицы. Важной отличительной особенностью больных АД и ПА явилась активация синтеза TNF α рядом инфекционных аллергенов, в частности, перфлявой, провиденцией, ксерозой, пневмококком и синегнойной палочкой. Максимальная концентрация TNF α обнаружена у больных крапивницей в ответ на воздействие пиогенного стрептококка (611,4 \pm 54,1 пг/мл). В целом индукция аллергенами провоспалительного медиатора TNF α более выражена при АД и крапивнице, уровень корреляции с кожными пробами и специфическим IgE достаточный: + 0,65 и + 0,71. Индуцированный синтез IL-4 и IFN определяли только в отношении этиологически значимых аллергенов. У детей, больных БА, синтез IL-4 максимально выражен в ответ на бытовые аллергены: аллерген домашней пыли — 260 \pm 16,5 пг/мл, *D. pteronissinus* — 311,7 \pm 21,8 пг/мл. Пищевые аллергены были причиной повышения синтеза данного цитокина у детей с АД и клиническими проявлениями ПА. Отмечен высокий уровень корреляции между показателями аллерген-индуцированного синтеза IL-4 и IgE (+ 0,81). Значительной активностью по тесту индукции IFN характеризовались лимфоциты больных возрастной группы 15–25 лет, имеющих клинические признаки АД в виде нейродермита. Наиболее часто в качестве этиотропных выступали аллергены эпидермальной группы, бытовые, некоторые пищевые (апельсин, коровье молоко, пшеничная мука, цельное яйцо, рисовая крупа) и инфекционные (кокковая группа и синегнойная палочка) аллергены. Полученные данные слабо коррелировали с уровнем специфического IgE (+0,38), но проявляли выраженное соответствие результатам анализа ГЗТ (+0,79). Предлагается использовать определение аллерген-индуцированного синтеза TNF в случаях сомнительных результатов общепринятых аллергопроб.

Влияние растворимых факторов фибробластов на продукцию провоспалительных цитокинов мононуклеарами периферической крови *in vitro*

Ю.Е. Бурда, С.Н. Нестеренко, С.М. Шевченко, И.Ю. Леонова
Курская областная клиническая больница

Предыдущий этап наших исследований был посвящен изучению продукции провоспалительных цитокинов в смешанной культуре мононуклеаров периферической крови (МПК) и аллогенных фибробластов различной степени зрелости. В дальнейшем было бы интересно изучить влияние растворимых медиаторов фибробластического происхождения на продукцию провоспалительных цитокинов (IL-1 β и TNF α) МПК здоровых доноров, больных с ожоговой болезнью (ОБ) в стадии токсемии и септикококемии и больных неспецифическим язвенным колитом (НЯК), а также влияние дексаметазона в высокой концентрации на функциональную активность фибробластов в данной модели. В качестве источника фибробластических растворимых медиаторов использовали суточный супернатант культур эмбриональных (СЭФ) и взрослых дермальных (СВФ) фибробластов. Во второй серии экспериментов фибробласты предварительно подвергали воздействию дексаметазона в концентрации 10⁻⁴ моль/л в течение 3ч с последующей отмывкой. Уровень цитокинов в культуральных средах определяли методом твердофазного ИФА на тест-системах фирмы «Протеиновый Контур» (С.-Петербург). Для оценки влияния СЭФ и СВФ на продукцию цитокинов вычисляли индекс влияния (ИВ):

$$\text{ИВ} = \frac{\text{концентрация цитокина в опыте «МПК + супернатант фибробластов»}}{\text{концентрация цитокина в контроле «МПК»}} \times 100\%$$

Для статистической обработки результатов использовали непараметрические методы Крускала-Уоллиса и Ньюмена-Кейлса.

Определить влияние СЭФ и СВФ на спонтанную продукцию TNF α не удалось, поскольку концентрация цитокина в большин-

стве проб оказалась ниже порога чувствительности тест-системы, а спонтанная продукция IL-1 β находилась на пороговом уровне во всех пробах. Для липополисахарид (ЛПС)-стимулированной продукции TNF α в группе здоровых доноров ИВ_{СЭФ} составил 53,56 \pm 7,35 %, ИВ_{СВФ} — 60,9 \pm 29,89 %; для предварительно обработанных дексаметазоном фибробластов ИВ_{СЭФ} составил 30,07 \pm 9,1 %, ИВ_{СВФ} — 31,52 \pm 15,46 % ($p < 0,05$ по сравнению с контролем во всех группах). В отношении ЛПС-стимулированной продукции IL-1 β ИВ_{СЭФ} составил 25,49 \pm 9,76 %, ИВ_{СВФ} — 42,79 \pm 8,8 %; для предварительно обработанных дексаметазоном фибробластов ИВ_{СЭФ} составил 17,03 \pm 2,27 %, ИВ_{СВФ} — 15,46 \pm 7,15 % ($p < 0,05$ по сравнению с контролем во всех группах). Межгрупповые отличия между СЭФ и СВФ не были статистически достоверными, как и тенденция к усилению ингибирующего эффекта супернатантов после предварительной обработки фибробластов дексаметазоном. Сопоставимые результаты получены в группах больных с НЯК и ОБ.

Таким образом, супернатант фибробластов оказывает значимый ингибирующий эффект на продукцию TNF α и IL-1 β МПК. Указанный эффект имеет тенденцию к усилению после предварительной обработки фибробластов дексаметазоном и не зависит от степени зрелости фибробластов.

Продукция провоспалительных цитокинов в условиях контактного взаимодействия аллогенных фибробластов и мононуклеаров периферической крови *in vitro*

Ю.Е. Бурда, С.Н. Нестеренко, С.М. Шевченко, И.Ю. Леонова
Курская областная клиническая больница

Роль фибробластов в качестве клеток-регуляторов воспалительных и иммунных процессов в настоящее время не подвергается сомнению. В литературе встречается достаточно работ, посвященных влиянию клеток-участниц воспаления и продуцируемых ими различных цитокинов на функциональную активность фибробластов. Однако влияние фибробластов на функциональную активность клеток-участниц воспалительного процесса остается малоизученным. В связи с этим, целью настоящей работы явилось изучение влияния аллогенных человеческих фибробластов на продукцию провоспалительных цитокинов (TNF α , IL-1 α) мононуклеарами периферической крови (МПК) здоровых доноров, больных с ожоговой болезнью (ОБ) в стадии токсемии и септикококсемии, а также больных неспецифическим язвенным колитом (НЯК) в условиях контактного взаимодействия. Для исследования использовали клетки 4–6 пассажей эмбриональных фибробластов (ЭФ) и дермальных фибробластов взрослого донора 28 лет (ВФ). Уровень цитокинов в культуральных средах определяли методом твердофазного ИФА на тест-системах фирмы «Протеиновый Контур» (С.-Петербург). Для оценки влияния ЭФ и ВФ на продукцию цитокинов вычисляли индекс влияния (ИВ):

$$\text{ИВ} = \frac{\text{концентрация цитокина в опыте «МПК + фибробласты»}}{\text{концентрация цитокина в контроле «МПК»}} \times 100 \%$$

Для статистической обработки результатов использовали непараметрические методы Крускала-Уоллиса и Ньюмена-Кейлса.

В группе здоровых доноров ИВ_{ЭФ} на спонтанную продукцию IL-1 α составил ($M \pm y$) 139,03 \pm 51,71 % ($p < 0,05$), ИВ_{ВФ} — 150,39 \pm 26,71 % ($p < 0,05$); на ЛПС-стимулированную ИВ_{ЭФ} — 215,24 \pm 88,02 % ($p < 0,01$), ИВ_{ВФ} — 319,18 \pm 178,78 % ($p < 0,01$). У больных НЯК для спонтанной продукции IL-1 α ИВ_{ЭФ} составил 130,5 \pm 27,04 % ($p < 0,05$), ИВ_{ВФ} — 195,84 \pm 87,45 % ($p < 0,05$); для стимулированной продукции ИВ_{ЭФ} — 395,02 \pm 307,41 % ($p < 0,01$), ИВ_{ВФ} — 327,85 \pm 138,52 % ($p < 0,01$). У пациентов с ОБ для спонтанной продукции ИВ_{ЭФ} составил 118,99 \pm 17,04 % ($p < 0,05$), ИВ_{ВФ} — 127,06 \pm 23,55 % ($p < 0,05$); для стимулированной ИВ_{ЭФ} — 117,36 \pm 40,66 % ($p > 0,05$), ИВ_{ВФ} — 106,69 \pm 43,51 % ($p > 0,05$). В то же время, во всех группах отмечали значительное подавление как спонтанной, так и ЛПС-стимулированной продукции TNF α в смешанной аллогенной культуре МПК и фибробластов по сравнению с МПК вплоть до

не определяемых данной тест-системой концентраций. Различия между ЭФ и ВФ по всем группам не были статистически значимы.

Таким образом, в условиях контактного взаимодействия как спонтанная, так и ЛПС-стимулированная продукция двух провоспалительных цитокинов — TNF α и IL-1 α — в смешанной культуре аллогенных фибробластов и МПК здоровых доноров, больных ОБ с эндотоксикозом и больных НЯК носят разнонаправленный характер. Данный феномен не зависит от степени зрелости фибробластов.

Влияние трансформирующего ростового фактора β на антиоксидантные свойства С-реактивного белка

А.А. Бутюгов, П.Г. Назаров
ГУ НИИ экспериментальной медицины РАМН, С.-Петербург

Реализация эффекторными молекулами иммунной системы своих специфических функций в раннюю фазу развития инфекции играет ключевую роль в развитии адекватного иммунного ответа. При этом эффект факторов воспаления зависит от их возможного взаимодействия с другими агентами как эндогенной, так и экзогенной природы. Ранее нами была показана способность реактанта острой фазы воспаления С-реактивного белка (CRP) связывать и нейтрализовать стрептококковый поробразующий тиол-активируемый цитотоксин стрептолизин О (СЛО). Известно, что трансформирующий ростовой фактор бета (TGF β) является модулятором дифференцировки и роста клеток, вовлеченных в процессы воспаления, клеточного и гуморального иммунного ответа, таких, как В-лимфоциты, Т-хелперы, тимоциты и НК-клетки, моноциты и макрофаги.

В данной работе исследовали влияние TGF β на антиоксидантные свойства CRP. Для оценки гемолитической активности СЛО и антиоксидантных свойств CRP использовали модель гемолиза человеческих эритроцитов (ЭЧ). В этой модели CRP в концентрациях 1,5–10 мкг/мл дозозависимо отменял гемолиз, обусловленный СЛО (НИИВС, СПб). Для оценки влияния TGF β на этот процесс, рекомбинантный TGF β человека в концентрациях 1 мкг/мл и выше предварительно инкубировали с CRP (в концентрациях 1,5, 3 и 10 мкг/мл) и СЛО, после чего к реакционной смеси добавляли 1 %-ю взвесь ЭЧ и после наступления 100 %-го гемолиза в контроле (СЛО + ЭЧ) смесь центрифугировали, удаляли неразрушенные ЭЧ и фотометрировали супернатант при 405 нм с помощью многоканального спектрометра «SLN Spectra».

Результаты показали, что TGF β не оказывает деструктивного действия на ЭЧ и не влияет на гемолиз в смесях, содержащих СЛО + ЭЧ. В то же время в смесях СЛО + ЭЧ, содержащих также 1,5 или 3 мкг/мл CRP, наблюдали достоверное снижение антиоксидантного действия CRP под влиянием TGF β . Таким образом, TGF β снижает способность CRP нейтрализовать гемолитическую активность бактериального токсина. Было также исследовано влияние TGF β на гемолиз ЭЧ в присутствии сублитических концентраций СЛО. При этом не было получено данных, свидетельствующих об усилении гемолитической активности токсина под действием TGF β .

Изложенные результаты показывают, что TGF β не взаимодействует со СЛО (не нейтрализует токсин и не усиливает его гемолитическую активность), однако блокирует антиоксидантную активность С-реактивного белка и, следовательно, взаимодействует с CRP.

Работа поддержана грантом РФФИ №01-04-49615.

Взаимодействие механизмов активации и ингибирования апоптоза нейтрофилов человека при действии эндотоксинов

М.Г. Винокуров¹, М.М. Юринская¹, И.Р. Прохоренко², В.А. Печатников¹
¹Институт биофизики клетки РАН, Пущино; ²Институт фундаментальных проблем биологии РАН, Пущино

В последние годы исследование апоптоза в клетках млекопитающих позволило установить основные механизмы его активации

ции и развития при действии различных модулирующих факторов как эндогенной, так и экзогенной природы. Несмотря на достигнутые успехи, механизмы активации и регуляции апоптоза при одновременном действии модулирующих апоптоз факторов на различные клетки организма остаются недостаточно изученными. Значительный интерес представляет изучение механизмов регуляции апоптоза клеток иммунной системы — нейтрофилов, основной функцией которых является защита организма человека от бактериальной инфекции. Известно, что бактерии оказывают модулирующее действие на регуляцию апоптоза клеток-мишеней. Это действие реализуется двумя механизмами: при фагоцитозе бактериальных клеток происходит в основном ускорение апоптоза клеток-мишеней, а при взаимодействии компонентов клеточной стенки грамотрицательных бактерий — липополисахаридов (эндотоксинов) — происходит ингибирование апоптоза нейтрофилов и других фагоцитов. Повышенный интерес к липополисахаридам (ЛПС) в последнее время связан с тем, что эти соединения играют ключевую роль в развитии эндотоксического шока. Сейчас установлены только отдельные детали механизма действия ЛПС на регуляцию апоптоза нейтрофилов. Поступив в кровь (из погибших грамотрицательных бактериальных клеток), эндотоксины взаимодействуют (образуют комплексы) с ЛПС-связывающими белками. Этот комплекс далее взаимодействует с мембранной формой CD14 рецептора, последний, в свою очередь, далее образует комплекс с Toll-like 4 рецептором. Сигнал активации с CD14 и Toll-like 4 рецепторов поступает на систему тирозинкиназ (Src, Lyn, Hck) и далее на p38MAPK- или ER-киназы. Взаимодействие p38MAPK- и ERK-зависимых внутриклеточных сигнальных путей определяет, произойдет ли ингибирование апоптоза нейтрофилов, что в свою очередь, играет важную роль в патогенезе сепсиса. Циркулирующие нейтрофилы являются короткоживущими клетками: время их полужизни составляет 8–12 ч, после чего они подвергаются апоптозу. В реализации спонтанного апоптоза принимают участие Fas-рецептор и p38MAPK-зависимые механизмы. Развитие апоптоза нейтрофилов при активации Fas-зависимого механизма (индукторами апоптоза) и при действии ЛПС зависит от последовательности воздействия этих модулирующих апоптоз факторов. Активация Fas-зависимого механизма, вызываемая ультрафиолетовым излучением диапазона С (до воздействия ЛПС), носит необратимый характер и не отменяется при последующем действии ЛПС.

Работа выполнена при финансовой поддержке фонда «Университеты России. Фундаментальные исследования».

Действие ионов ртути на респираторный взрыв и регуляцию апоптоза нейтрофилов человека

М.Г. Винокуров¹, М.М. Юринская¹, Д.Г. Садилова¹, Т.В. Беляева¹,
А.В. Суликов², В.А. Печатников¹

¹Институт биофизики клетки РАН, Пущино; ²Больница Пущинского научного центра

За последнее десятилетие токсическая нагрузка значительно превысила ту, в которой эволюционно формировался организм человека, стремительно нарастает экологически-зависимая патология. Особое значение в этих условиях приобретает воздействие на организм человека экологически вредных факторов, в частности, соединений тяжелых металлов. Действие различных патогенных факторов, как известно, в значительной степени изменяет функционирование клеток иммунной системы, в частности, нейтрофилов, играющих важную роль в норме и при различных патологических состояниях организма человека. Значительный интерес представляет исследование молекулярных механизмов регуляции апоптоза нейтрофилов. Одним из методов лечения различных заболеваний является ультрафиолетовое облучение крови. Этот метод в настоящее время достаточно широко применяется при лечении гнойно-септических, сердечно-сосудистых и других заболеваний. В медицинских целях чаще всего используется ультрафиолетовое облучение диапазона С (УФС), однако молекулярные механизмы его действия практически не выяснены. Ранее нами было показано, что УФС вызывает ускорение апоптоза культивируемых *in*

in vitro нейтрофилов человека. В настоящей работе проведено исследование совместного действия ионов ртути (HgCl₂) и УФС на развитие апоптоза культивируемых нейтрофилов человека. Нейтрофилы выделяли из периферической крови здоровых доноров на двухслойном градиенте фиколла-верографина. После этого клетки дважды отмывали фосфатным буфером, рН 7,4 (PBS) и облучали УФС-светом с длиной волны 254 нм на аппарате «Изоolda» МФ-73М (контроль). Опытные образцы перед облучением в течении 15 мин предварительно инкубировали с ионами ртути (0–10 мкМ). После облучения клетки культивировали в среде RPMI-1640 с 10 % эмбриональной телячьей сывороткой (Sigma), 1 % L-глутамина, 1 % пенициллина и стрептомицина при 37 °С в атмосфере, содержащей 5 % CO₂ (концентрация клеток 1×10⁶/мл). Респираторный взрыв нейтрофилов регистрировали по люминол-зависимой хемиллюминисценции. Увеличение концентрации HgCl₂ (0–5 мкМ) вызывало дозозависимое увеличение ингибирования респираторного взрыва нейтрофилов при активации пептидом fMLF (1 мкМ). Исследование действия ионов ртути на апоптоз нейтрофилов показало, что хлористая ртуть при концентрации 10 мкМ вызывает полное ингибирование индуцированного ультрафиолетом С апоптоза нейтрофилов. При отсутствии УФС не происходит ингибирования спонтанного апоптоза нейтрофилов, а наблюдается даже небольшое увеличение процента клеток с деградированной ДНК. Для всех проб — и облученных ультрафиолетом С, и необлученных — жизнеспособность оставалась равной жизнеспособности контрольных клеток (~ 95–98 %).

Полученные результаты позволяют предположить, что ионы ртути ингибируют вызванную ультрафиолетом С активацию Fas-рецептор-зависимого механизма регуляции апоптоза нейтрофилов человека. Fas-зависимый механизм, по всей видимости, играет ключевую роль в развитии апоптоза, вызванного ультрафиолетом С.

Работа выполнена при финансовой поддержке фонда «Университеты России. Фундаментальные исследования», грант № 991928.

Возможности и перспективы кинетической регистрации активности комплемента

Л.В. Галебская

С.-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И.П. Павлова

Кинетический метод определения активности комплемента нашел широкого применения в исследовании функциональной активности системы. В настоящее время общепринятыми являются параметры CH₅₀ и AP₅₀, имеющие неоднозначную трактовку и весьма неудобные для исполнения. Предложенное нами расширение параметров оценки кинетической кривой иммунного лизиса позволяет выявлять различные стороны функционирования комплемента. В экспериментах с очищенными компонентами альтернативного пути активации комплемента была установлена обратная зависимость между количеством фактора D и величиной индукционного периода. Как показал корреляционный анализ, скорость комплемент-зависимого гемолиза по альтернативному пути и индукционный период оказались независимыми величинами. Варьирование концентрации C3-компонента в условиях активации альтернативного пути выявило волнообразный характер зависимости скорости гемолиза от концентрации этого компонента. Можно предположить, что концентрация C3 не отражает функциональной активности системы. В классическом пути активации комплемента отмечена высокая степень отрицательной корреляции между индукционным периодом и скоростью комплемент-зависимого гемолиза. Имеются данные о том, что лимитирующим звеном в этом протеолитическом каскаде является концентрация компонента C1. При использовании в качестве мишеней для действия комплемента несенсибилизированных эритроцитов наблюдали уменьшение корреляционных связей и существенное изменение не столько скорости, сколько величины индукционного периода. Определение параметров кинетических кривых последовательно добавляемых в сыворотку крови чужеродных эрит-

роцитов позволил нам ввести величину, именуемую «гемолитическая емкость комплемента» (ГЕК). Показатель ГЕК зависел от количества функционально активных компонентов системы и, таким образом, отражал ее литический потенциал. Динамика изменения скорости последовательно добавляемых в сыроворотку крови эритроцитов отражала ряд регуляторных воздействий на комплемент. Так, в процессе лизиса эритроцитов кролика по классическому пути было выявлено торможение процесса стромой лизированных клеток. В альтернативном пути было обнаружено очень значительное (в 2–4 раза) ускорение комплемент-зависимого гемолиза под действием уже лизированных эритроцитов кролика. Были получены доказательства того, что процесс ускорения гемолиза был связан с явлением реактивного лизиса. Поскольку в сыворотке крови имеется значительное количество регуляторных белков, ограничивающих каскад комплемента, полагаем, что предложенный нами коэффициент реактивного лизиса отражает потенциал антикомплементной системы сыворотки крови. Указанные параметры динамики комплемент-зависимого гемолиза используются нами для оценки комплемента у пациентов, страдающих различными заболеваниями, а также для поиска эффективных регуляторов системы.

Имунофармакологическая характеристика эндогенного ингибитора иммуногенеза

И.Б. Жукова¹, Л.С. Толвинская¹, Л.Ю. Телегин², Р.Н. Степаненко³, Л.З. Карпец¹, А.И. Довгий¹, В.Г. Пухальская¹

¹Российский государственный медицинский университет МЗ РФ, Москва; ²Центр теоретических проблем физико-химической фармакологии РАН, Москва;

³Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва

Ранее нами были описаны свойства частично очищенного иммунодепрессивного фактора (ИФ) из печени животных. ИФ эффективно подавлял первичный и вторичный иммунный ответ мышей на Т-зависимый и Т-независимый антигены, реакцию бласттрансформации лимфоцитов человека и реакцию трансплантат-против-хозяина. Наибольший эффект достигался при введении препарата в индуктивную фазу иммуногенеза. ИФ не обладал токсическими свойствами. В настоящей работе мы провели хроматографический анализ ИФ методом ВЭЖХ. Показали, что исследуемый образец ИФ содержит фракции с молекулярными массами 9000–1000 и 26000–27000 Да, обладающие выраженной иммунодепрессивной активностью. ИФ термостабилен и чувствителен к действию протеаз. Эти и ранее полученные данные позволяют высказать предположение, что ИФ первоначально синтезируется в печени в виде молекулы-предшественника, последующая метаболическая модификация которого приводит к образованию низкомолекулярного ингибитора иммунного ответа. Для выяснения механизмов иммунодепрессивного действия ИФ было интересно исследовать взаимоотношения ИФ с хорошо изученными эндогенными регуляторами иммуногенеза при их совместном введении. С этой целью провели изучение комбинированного влияния на иммунный ответ мышей ИФ и миелогида (М) — известного препарата, созданного на основе иммунорегуляторных цитокинов костного мозга. Установлено, что введение ИФ непосредственно перед М практически полностью отменяло эффект последнего. Введение ИФ сразу же после М не оказывало никакого влияния на проявление иммуностимулирующей активности М. Полученные данные позволяют предположить наличие у ИФ и М конкурентных механизмов регуляции иммунного ответа.

Использование регуляторных и метаболических параметров иммунокомпетентных клеток крови для оценки интенсивности реакций организма на различные воздействия

Л.Б. Захарова, В.В. Фелелова, Л.А. Нагирная, Е.В. Маркова
НИИ медицинских проблем Севера СО РАМН, Красноярск

Многочисленные исследования последних десятилетий убедительно показали, что метаболические параметры иммуноком-

петентных клеток крови адекватно отражают направленность обменных и регуляторных процессов целостного организма.

Лимфоцит, обладая рецепторами ко всем основным регуляторным веществам, включая цитокины, способен интегрировать импульсы и отвечать на них в первую очередь изменениями метаболизма.

Анализ обширного материала, собранного сотрудниками Института медицинских проблем Севера СО РАМН при обследовании коренных и пришлых жителей азиатского Севера и средней полосы Сибири, позволил выявить закономерные изменения метаболических параметров лимфоцитов крови в ответ на самые различные воздействия: физические нагрузки, эмоциональный стресс, переезд в новую климатическую зону.

Наиболее информативными оказались показатели активности ферментов цикла трикарбоновых кислот — сукцинатдегидрогеназы (СДГ), пентозного шунта — глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы и уровень таких регуляторных соединений, как катехоламины.

Монголоидные популяции Севера отличались низкой реактивностью, отвечая лишь на достаточно высокие физические и эмоциональные нагрузки, но при этом они сохраняли резервы и быстрее возвращались к исходному состоянию; более выраженными у них были реакции торможения. Для этих популяций характерен энергосберегающий тип обмена, в то время как для европеоидов — более высокий уровень обмена и ответных реакций.

При обследовании европейского населения Сибири выявлены связи реактивности с конституцией человека. Наиболее высокой реактивностью на эмоциональный стресс отличались лица мускульного типа, у которых значительно возрастала активность СДГ и содержание катехоламинов в лимфоцитах, наиболее инертными были лица брюшного соматотипа.

Таким образом, указанные выше регуляторные и метаболические параметры лимфоцитов могут использоваться в качестве достоверных тестов для оценки реакции организма на разнообразные воздействия.

Исследование биологической активности IL-1 α в системе *in vivo*

А.А. Казаков, М.А. Анциферова, А.С. Симбирцев
ГНЦ НИИ особо чистых биопрепаратов, С.-Петербург

Интерлейкин 1 (IL-1) является иммуностимулятором с широким спектром биологической активности. Применение рекомбинантных препаратов на основе IL-1 β показало их высокую клиническую эффективность при лечении различных патологических состояний у человека и животных. Вместе с тем, другой представитель этого семейства — IL-1 α — не получил столь широкого распространения в клинической практике. Несмотря на то, что механизмы действия этих цитокинов во многом сходны, до сих пор остается невыясненным ряд важных вопросов. Данная работа была предпринята с целью охарактеризовать биологическое действие рекомбинантного IL-1 α человека в системе *in vivo*. Эксперимент проводили на гибридных мышках. Животных разбили на три группы, которые соответствовали разным дозам этого цитокина (2, 20 и 200 нг на мышь), вводящегося внутривенно. Контрольной группе животных вводили стерильный физиологический раствор. На разных сроках после инъекции (1 ч, 3 ч, 7 ч, 1 сут., 3 сут.) у 4 мышей из каждой группы забирали периферическую кровь и перитонеальный экссудат для постановки реакции хемилюминесценции (ХЛ) и селезенку для постановки реакции бласттрансформации лимфоцитов (РБТЛ).

Изучение спонтанной ХЛ клеток лаважа показало достоверное ($p < 0,05$) увеличение реакции для дозы 2 нг на сроке 3 ч после инъекции (на остальных дозах различия были недостоверны). ХЛ перитонеальных клеток, активированных зимозаном, достоверно увеличивалась через 3 ч, 7 ч и 1 сут. после введения IL-1 α 2 дозах 2 и 20 нг ($p < 0,05$). Наблюдали достоверную обратную дозовую зависимость: максимальные значения были получены для дозы 2 нг и составляли $826 \pm 73,2$ имп/с (3 ч), для 20 нг — $320,5 \pm 57,8$ имп/с (1 сут.). При изучении спонтанной ХЛ

лейкоцитов периферической крови не получили достоверных отличий. Для клеток периферической крови, активированных зимозаном, наибольшие значения были получены для дозы 200 нг (максимум через 3 ч: $88,9 \pm 7,6$ имп/с; контрольная группа — $25,1 \pm 5,6$). Доза 2 нг не давала достоверных отличий по сравнению с соответствующими данными в контрольной группе. Постановка РБТЛ показала, что при всех трех дозах происходит достоверное увеличение пролиферативной активности КонА-стимулированных Т-лимфоцитов на первые и третьи сутки после инъекции. Максимальный ответ был получен на третьи сутки для дозы 20 нг (52087 ± 3865 ; контроль — 13005 ± 3845). Достоверную дозовую зависимость выявить не удалось.

Наблюдаемые различия действия разных доз этого цитокина на местном и системном уровнях можно объяснить следующим образом. Применение высоких доз IL-1 α (20, 200 нг) на местном уровне приводит к десенситизации клеток лаважа и переходу их в состояние анергии. Напротив, для увеличения интенсивности протекания неспецифических реакций на системном уровне (периферическая кровь) необходимы более высокие дозы этого цитокина. Активация специфического звена иммунитета (пролиферация Т-лимфоцитов селезенки) поддерживает широкий спектр биологической активности этого цитокина. Понимание этих процессов должно лежать в основе грамотного применения рекомбинантных препаратов на его основе в клинической практике.

С3-компонент комплемента в процессе хранения сыворотки крови больных неходжкинскими лимфомами

О.А. Князева¹, Д.Д. Сакаева²

¹Институт биохимии и генетики Уфимского научного центра РАН; ²Башкирский государственный медицинский университет, Уфа

Исследование катаболизма С3-компонента комплемента, занимающего основную позицию в биохимических каскадах реакций классического и альтернативного путей, имеет большое значение для диагностики опухолевого процесса. Неходжкинские лимфомы (НХЛ) — большая группа заболеваний, в генезе которых иммунологические нарушения играют ведущую роль. Сохраняющаяся во всем мире тенденция к увеличению заболеваемости НХЛ обуславливает необходимость более детального изучения всех аспектов этой патологии.

В основе инициации активации комплемента по альтернативному пути лежит гидролиз тиоэфирной связи в альфа-цепи С3, сопровождающийся появлением его конформационной С3b-подобной формы — С3(Н₂О). Целью наших исследований явилось изучение конформационного изменения С3 в процессе хранения сыворотки крови у больных НХЛ в сравнении с контрольной группой здоровых людей.

Исследован уровень С3- и С3(Н₂О)-компонентов комплемента в сыворотке крови 59 больных НХЛ и 12 здоровых доноров. Уровень С3 и С3(Н₂О) определяли методом иммуоферментного анализа с помощью специфических моноклональных антител в одновременно размороженной сыворотке крови без и с добавлением 0,1 М раствора ЭДТА (рН 7,4), которую перед замораживанием инкубировали при 37 °С в течение 1,5; 3; 5; 7; 9; 11 и 24 ч. Часть материала замораживали повторно.

Показано, что в процессе хранения крови происходят изменения уровня С3 и С3(Н₂О). При хранении сыворотки крови от 3 до 7 ч концентрация С3(Н₂О) у больных НХЛ значительно превышала соответствующие показатели в контрольной группе ($p < 0,001$). Через 9 ч уровень С3(Н₂О) при патологии снижался до нормального, а к 11 часу возвращался к исходному. Через 24 ч уровень показателя не отличался от контрольного. Изменение С3(Н₂О) после обработки крови ЭДТА носило другой характер: к 3-у ч уровень его соответствовал таковому в контрольной группе, через 5 и 9 ч возрастал ($p < 0,001$), к 11-у ч вновь снижался, оставаясь на уровне, превышающем контроль ($p < 0,01$) до конца эксперимента.

По уровню С3 в сыворотке крови основные отличия наблюдали через 3, 5, 11 и 24 ч после забора крови. После обработки

ЭДТА кривая катаболизма С3 при НХЛ характеризовалась наличием небольшого 5-часового пика падения и смещением 7-часового пика на 9 ч.

После вторичного размораживания С3(Н₂О) в плазме больших полностью отсутствовал.

Таким образом, время, способ хранения (без и с добавлением ЭДТА), повторное размораживание влияют на изменение уровня С3 и С3(Н₂О). Катаболизм С3 при НХЛ отличается от нормы, имеет свой индивидуальный характер, что может быть использовано при диагностике опухолевого процесса.

Фактор роста сосудистого эндотелия как регулятор ангиогенной активности макрофагов

А.В. Крылов, Е.П. Киселева, В.И. Лядыно, О.Е. Зубарева

Научно-исследовательский институт экспериментальной медицины РАМН, С.-Петербург

К настоящему моменту показано, что активность макрофагов играет ключевую роль в ангиогенезе. Известно, что мононуклеарные фагоциты способны секретировать целый спектр как про-, так и антиангиогенных медиаторов, во многом определяя процесс неоваскуляризации. Механизмы регуляции ангиогенной активности макрофагов мало изучены, и практически отсутствуют данные о влиянии ангиогенных факторов, в частности фактора роста сосудистого эндотелия (VEGF), на эти процессы. В норме этот медиатор в крови и биологических жидкостях не определяется, но конститутивная экспрессия мРНК VEGF детектируется во многих тканях организма. При активации ангиогенеза, например, при заживлении ран, основными продуцентами VEGF в организме могут являться сами макрофаги, а также тучные клетки, нейтрофилы и другие клеточные типы.

Целью настоящего исследования послужило изучение влияния VEGF на функциональную активность перитонеальных макрофагов мыши (пиноцитоз, продукция нитроксида и супероксидных анионов, активность фермента 5'-нуклеотидазы) и экспрессию ими мРНК VEGF, как проангиогенного фактора, и мРНК тромбоспондина-1 (TSP-1), обладающего антиангиогенной активностью. Перитонеальные макрофаги получали промыванием брюшной полости животных средой RPMI 1640, содержащей 10 % фетальную сыворотку. Инкубацию клеток с исследуемым медиатором проводили в течение 4 и 24 ч при 37 °С. Продукцию нитроксида анионов определяли по содержанию NO₂ в супернатантах макрофагов с помощью реактива Грисса; продукцию супероксид анионов — в НСТ-тесте; пиноцитоз — по поглощению красителя нейтрального красного; активность 5'-нуклеотидазы — биохимическим методом — по образованию неорганического фосфата. Уровень экспрессии мРНК VEGF и TSP-1 оценивали методом ОТ-ПЦР со специфическими праймерами.

Полученные результаты выявили следующие эффекты: в концентрациях 50 и 100 нг/мл VEGF не оказывал влияния на показатели пиноцитоза в исследуемых клетках, но в тех же концентрациях стимулировал продукцию клетками нитроксида аниона. В концентрации 100 нг/мл VEGF снижал активность 5'-нуклеотидазы и подавлял индуцированный форболовым эфиром синтез супероксид аниона, при этом не оказывая влияния на его спонтанную продукцию. Результаты изучения экспрессии мРНК в макрофагах показали, что VEGF дозозависимо усиливает экспрессию мРНК VEGF и TSP-1 на сроке 24 ч. Полученные данные указывают на способность VEGF усиливать как ангиогенную (стимуляция продукции нитроксида анионов, экспрессия мРНК VEGF), так и антиангиогенную (подавление продукции супероксид анионов и стимуляция экспрессии мРНК TSP-1) функции макрофагов. Впервые показано, что VEGF может регулировать экспрессию собственной мРНК и создавать дополнительную петлю усиления продукции ангиогенной молекулы. Одновременная стимуляция как ангиогенной, так и антиангиогенной активности, по-видимому, свидетельствует о дифференцированной роли макрофагов на разных этапах ранозаживления.

Работа поддержана грантами РФФИ № 00-04-49430 и 01-04-06564.

Влияние витаминов А и Е на ультраструктуру тимуса и шейно-грудного ганглия после воздействия гербицида 2,4-дихлорфеноксисукусной кислоты

К.И. Кузнецова

Башкирский государственный аграрный университет, Уфа

Хлорорганические токсиканты занимают важное место среди химических веществ, циркулирующих в биосфере. Этому способствует их физико-химическая стойкость. Выявление токсичности и отдаленных последствий влияния гербицидов на нервную и иммунную системы является актуальным для медицинской и ветеринарной практики.

В опыте использовали 20 белых крыс 3–4-месячного возраста, которые были разделены на 5 групп. Одна группа была интактной. Крысам 2–5 групп в течение 28 сут. внутрижелудочно вводили аминную соль 2,4-дихлорфеноксисукусной кислоты (2,4-ДА) в суммарной дозе LD₅₀. Начиная со второго дня эксперимента, животным 3-й группы перорально вводили витамин А в дозе 50 мг/кг, крысам 4-й группы — витамин Е в дозе 300 МЕ. Животные 5-й группы получали сочетание витаминов А и Е в аналогичных дозах. Убой животных проводили спустя 60 сут. с начала эксперимента.

Исследовали кусочки тимуса и шейно-грудного ганглия классическими гистологическими, электронно-микроскопическим и морфометрическими методами. В тимусе крыс 2-й группы по сравнению с контрольной отмечено уменьшение корково-мозгового индекса. Ядра отдельных лимфоцитов содержали несколько ядрышек. В цитоплазме лимфоцитов тимуса и нейроцитов шейно-грудного ганглия было снижено количество органелл: цистерн гранулярного эндоплазматического ретикулума (ГЭР), комплекса Гольджи, свободных рибосом и полисом. Митохондрии были набухшие, с просветленным матриксом. Выявленные нами ультраструктурные изменения в тимусе и шейно-грудном ганглии позволили сделать заключение, что воздействие гербицида 2,4-ДА затрагивает элементы иммунной и нервной систем. В отдельных лимфоцитах и макрофагах тимуса у животных, получавших витамины, происходит восстановление и увеличение содержания цитоплазматических органелл, что, следовательно, ведет к увеличению их функциональной активности. В нейроцитах шейно-грудного ганглия усиливается морфо-функциональная активность аппарата синтеза белка: цистерн ГЭР удлиняются, в митохондриях возрастает плотность крист, увеличивается количество свободных полисом.

Следовательно, витамины А и Е создают оптимальные условия для развития механизмов восстановления внутриклеточных структур иммунной и нервной систем и повышения их функциональной активности.

Морфологические изменения в тимусе и шейно-грудном ганглии под влиянием Т-активина и комплекса витаминов А и Е

К.И. Кузнецова

Башкирский государственный аграрный университет, Уфа

В настоящее время большое внимание уделяется изучению морфо-функционального состояния органов иммунной системы при воздействии цитотоксинов и иммунобиологических препаратов. При этом нельзя не учитывать их действие на структурные элементы нервной системы. Изучение взаимодействий нервной и иммунной систем под влиянием различных факторов является необходимым условием для разработки новых методов диагностики и лечебно-стимулирующего действия на организм. В эксперименте использовали 24 беспородные крысы 3–4-месячного возраста, которые были разделены на 6 групп. Исследовали звездчатые узлы и тимус классическими гистологическими, электронно-микроскопическим и морфометрическими методами. В группах, получавших витамины А и Е и их сочетание, наблюдали реактивные изменения клеток тимуса, которые выражались в увеличении межклеточных пространств, заполненных веществом средней электронной плотности. В большинстве лимфоцитов гетерохроматин локализовался преимущественно по периферии ядра, иногда отмечали участки

расширения перинуклеарного пространства, в цитоплазме было увеличено количество свободных полисом по сравнению с соответствующими показателями в контрольной группе, макрофаги содержали большое количество фагосом. У животных, получавших Т-активин, лимфоциты характеризовались гетерогенным расположением хроматина. В ядре макрофагов отчетливо проявлялся гранулярный компонент ядрышка и большое количество гранул рибонуклеопротеидов (РНП), крупные фагосомы с содержимым телец пузырьковидной формы. В кариолемме четко были видны поры. Цитоплазма содержала удлиненные митохондрии, а также большое количество свободных рибосом и полисом. В ядрах нейроцитов шейно-грудного ганглия было выявлено хорошо выраженное ядрышко и увеличенное содержание РНП-гранул. В цитоплазме располагалось большое количество митохондрий, свободных рибосом и полисом, цистерны гранулярного цитоплазматического ретикулума были расширены, нейросателлиты имели крупные ядра с низкой электронной плотностью.

Полученные результаты свидетельствуют, что использование Т-активина и витаминов А и Е вызывает увеличение морфо-функциональной активности в клетках тимуса, в нейроцитах и нейроглиальных элементах шейно-грудного ганглия. Т-активин оказывает более выраженное действие по сравнению с витаминами А и Е.

Роль белков с лектиновыми свойствами в функционировании системы комплемента

В.М. Лахтин

ГУ Московский НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского МЗ РФ, Москва

Рассмотрено участие эндогенных и экзогенных растворимых и рецепторных лектинов (углеводсвязывающих белков неиммунноглобулиновой природы, обратимо узнающих углеводную часть гликоконъюгатов без их химической модификации) в инициации, амплификации и терминеции системы комплемента (СК) биологических жидкостей беспозвоночных и позвоночных организмов. Рассмотрено вовлечение лектин-углеводных взаимодействий в СК в рамках функционирования неспецифического врожденного иммунитета животных. Охарактеризована углеводная часть некоторых ключевых компонентов СК, а также отмечены компоненты СК со свойствами лектинов. Приведены примеры чувствительности протекания отдельных реакций в рамках СК млекопитающих в отношении экспонированных сахаридов и гликанов (например, сиалированных) на поверхности экзогенных и эндогенных молекул. Рассмотрена группа маннансвязывающих лектинов (МСЛ) и Ра-липополисахарид-реактивных лектинов сыворотки млекопитающих, которые в комплексах с эндогенными сериновыми протеиназами участвуют в инициации классического пути СК (КСК) и потребления С4-компонента КСК. Рассмотрена роль фиколинов (лектинов) в образовании функционально активных комплексов с протеиназами и другими белками, вовлекаемых в СК. Рассмотрены группы растворимых и рецепторных лектинов позвоночных, доменная организация которых, наряду с углеводсвязывающим (лектиновым) концевым доменом, включает также повторы регулирующих СК доменов.

Рассмотрена пространственная структура углеводсвязывающего участка МСЛ млекопитающих и его комплекса с сахарадами. Отмечены структурно-функциональные сходные и различающиеся свойства МСЛ и С1q. Сформулировано представление о минимальной и одной из наиболее ранних в эволюционном плане СК (АСК — альтернативном пути СК) в случае беспозвоночных (на примере СК оболочников), включающей С3 (сходный с С3 позвоночных), лектин (аналогичный МСЛ позвоночных) и рецептор фрагментов компонентов комплемента (аналогичный CR1 позвоночных). Отмечена эволюционная взаимосвязь функционирования СК и системы свертывания плазмы с вовлечением эндогенных растворимых и рецепторных лектинов со сходной специфичностью. Рассмотрен эволюционный аспект участвующих в СК лектинов. Приведены данные о регулирующем КСК и АСК действии экзогенных лектинов и полисахари-

дов и описаны возможные молекулярные механизмы такого действия в жидкой фазе, на твердой фазе, клеточной поверхности и с учетом межклеточных взаимодействий. Отмечены перспективы изучения лектин-гликоконъюгатных взаимодействий в СК для медицинской и сельскохозяйственной биотехнологии и фармакологии.

Интерлейкин 1 β — фактор агглютинации сперматозидов

Д.Л. Луцкий¹, А.А. Николаев¹, А.С. Симбирцев², В.В. Евдокимов³,
С.В. Выборнов⁴

¹Кафедра общей и биоорганической химии Астраханской государственной медицинской академии; ²ГНЦ НИИ особо чистых биопрепаратов МЗ РФ, С.-Петербург; ³НИИ урологии МЗ РФ, Москва; ⁴Центр планирования семьи и репродукции, Астрахань

Целью настоящей работы стало изучение возможных биологических эффектов интерлейкина 1 β (IL-1 β) и их молекулярных основ в эякулированной сперме.

В работе были использованы образцы эякулятов 17 фертильных мужчин (доноры спермы). В опыте в эякулят через 10 мин после полного разжижения коагулята добавляли препарат IL-1 β из расчета 1,0 мкг IL-1 β на 1,0 мл эякулята. Параллельно опыту ставили три контроля. Ввиду того, что препарат IL-1 β был стабилизирован человеческим альбумином, в первом контроле в сперму добавляли соответствующее количество препарата человеческого альбумина. Во втором контроле в сперму добавляли известный эффектор агглютинации и агрегации сперматозоидов — гепарин (1,0 мкг на 1,0 мл спермы). В третьем контроле оставляли нативный образец спермы без добавления каких-либо ксеинобиотиков. Все образцы спермы (контрольные и опытные) инкубировали при температуре 37 °С в течение 120 мин. Через каждые 10 мин, начиная с первой минуты инкубации, проводили исследование параметров качества спермы (количество активно подвижных сперматозоидов и их скорость, количество слабо подвижных форм и характер их движения, количество неподвижных сперматозоидов и их жизнеспособность, состояние акросомы, наличие агглютинации и агрегации сперматозоидов).

В опыте, начиная с первой минуты инкубации, наблюдали образование агглютинатов сперматозоидов (6–9 в поле зрения). В первом и третьем контроле агглютинации сперматозоидов не происходило. Во втором контроле отмечали образование агглютинатов и агрегатов сперматозоидов (агглютинатов 22–29 в поле зрения, агрегатов — 4(+)), более выраженное, чем в опыте. Через 30–40 мин после начала эксперимента количество агглютинатов в опыте резко сокращалось (в среднем в 2,5 раза), и через 60 мин агглютинаты практически не выявлялись, в то время как во втором контроле количество агглютинатов и характер агглютинации достоверных изменений не претерпевали.

Поверхность сперматозоидов покрывает негемовый ферропротеин — скаферрин, который в норме выполняет ряд биологических функций, важных для фертилизации сперматозоидов и, в том числе, благодаря своему относительно высокому поверхностному положительному заряду, препятствует агглютинации сперматозоидов. Предположив, что агглютинация сперматозоидов, индуцированная IL-1 β , может протекать опосредованно — через взаимодействие со скаферрином, мы проверили возможность межмолекулярного взаимодействия между ними. Используя иммуноэлектрофорез в агаровом геле, мы получили следующие результаты: относительная электрофоретическая подвижность (ОЭФП) чистого препарата скаферрина человека — $0,59 \pm 0,007$ (за 1,0 выбрана электрофоретическая подвижность альбумина человека), ОЭФП комплекса «скаферрин + интерлейкин 1 β » — $0,77 \pm 0,008$, ОЭФП комплекса «скаферрин + гепарин» — $0,92 \pm 0,011$. При добавлении к скаферрину препарата альбумина человека электрофоретическая подвижность скаферрина достоверно не изменилась.

Таким образом, можно сделать следующие выводы: 1) IL-1 β способен вызывать агглютинацию сперматозоидов, 2) обусловленная им агглютинация носит обратимый характер, 3) возможно, агглютинация сперматозоидов, вызванная IL-1 β , опосредована через его взаимодействие с поверхностным гликопротеином сперматозоидов — скаферрином.

Влияние низкоинтенсивного лазерного излучения на некоторые показатели патогенеза воспаления

А.Е. Машков, М.С. Суровикина, В.И. Щербина, В.Г. Цуман, Е.З. Друзюк,
Д.А. Пыхтеев

МОНИКИ им.М.Ф. Владимирского, Москва

В настоящей работе изучено состояние АИР и калликреин-кининовой системы крови (ККСК) на разных стадиях течения гнойно-септических заболеваний (ГСЗ) у 82 детей в возрасте от 2 до 12 лет (больных разлитым гнойным перитонитом — 24, десструктивной пневмонией — 28, острым гематогенным остеомиелитом — 30). Состояние ККСК оценивали путем определения колориметрическим методом БАЭЭ-активности 3 форм калликреина плазмы крови и показателя адсорбции калликреина на каолине. Из показателей АИР исследовали гуморальный, клеточный иммунитет и некоторые факторы неспецифической резистентности организма. Названные показатели определяли до лечения, через 7–10 дней и 3–4 нед. после лечения. Больных лечили традиционными методами в сочетании с лазеротерапией (ЛТ). Было 40 детей в группе сравнения и 42 ребенка в основной группе. При этом установлено, что у 9–13 % больных в зависимости от отдельных показателей ГСЗ протекали на фоне умеренного усиления кининогенеза (10–30 %-е повышение активности общего калликреина). В 87–92 % случаев констатировано ослабление активности ККСК. В процессе лечения у всех больных, получавших ЛТ — независимо от характера изменений кининогенеза — происходило его усиление на 16–31 % у больных с повышенной активностью ККСК и более значительное (на 70–140 %) у детей с ослабленным кининогенезом. В группе сравнения восстановление ослабленного кининогенеза было менее выраженным и более длительным. Даже через месяц отмечалось снижение активности общего калликреина плазмы на 20 %.

Исследование иммунного статуса выявило нарушение во всех звеньях иммунной системы, особенно отмечено снижение активности клеточного иммунитета, нарушение баланса иммуноглобулинов сыворотки крови (А, М, G), блокада фагоцитарной системы. Более выраженным было влияние ЛТ на Т-систему иммунитета. Количество Т-РОК повышалось с 35 до 46 %, а Т-РОК-акт. — с 18 до 39 %; в группе же сравнения содержание Т-РОК и Т-РОК-акт. Было соответственно — 34 и 33 %. Число В-лимфоцитов существенно не отличалось в исследуемых группах. Под влиянием ЛТ происходила нормализация концентрации сывороточного IgG, что проявлялось снижением его количества с $20,1 \pm 3,0$ до $12,4 \pm 2,5$ г/л у 20 % детей, а у 30 % детей с исходно пониженным уровнем отмечалось повышение до нормальных значений. Низкое у большинства детей содержание IgA нормализовалось под влиянием ЛТ лишь у 25 %. В условиях ЛТ установлена активация микробицидной системы нейтрофильных гранулоцитов. Так, при проведении теста на восстановление нитросинего тетразолия мы отметили резкое увеличение количества формазанположительных нейтрофилов — с $2,3 \pm 0,7$ % перед лечением до $25,3 \pm 0,6$ % после 10-го сеанса ЛТ (при норме $7,7 \pm 0,6$ %).

Таким образом, ЛТ в комплексном лечении ГСЗ у детей оказывает положительное влияние на воспалительный процесс, в 2–3 раза быстрее и эффективнее стимулирует ККСК и Т-клеточный иммунитет, нормализуя ослабленный кининогенез и восстанавливая защитно-регуляторную функцию ККСК. Умеренное усиление активности ККСК при ГСЗ является благоприятным фактором, улучшающим клиническое течение ГСЗ и другие параклинические показатели.

Роль окислительного стресса в формировании синдрома системной воспалительной реакции

И.Н. Пасечника, Ю.М. Азизов, В.В. Крылов, О.И. Бугровская, Э.Б. Анищук
Учебно-научный центр МЦ УД Президента РФ, Москва

Гнойно-септические осложнения являются одной из основных причин смерти больных в стационарах. Несмотря на достижения современной медицины, число больных с септическими осложнениями после хирургических вмешательств не уменьшается. Для характеристики больных в критических состояниях (КС) в

добавление к понятию о сепсисе, как системном ответе на воспаление, инфекцию и токсические продукты микроорганизмов, был введен термин «синдром системной воспалительной реакции» (ССВР). В настоящий момент ССВР у хирургических больных рассматривают как ответ не только на инфекцию, но и на агрессию — оперативное вмешательство, шок, ишемию и т.д.

В патогенезе ССВР большое значение отводится молекулярным медиаторам, в том числе цитокинам, продуктам метаболизма арахидоновой кислоты и активированным формам кислорода (АФК). Эти вещества выделяются собственными клетками организма — в основном макрофагами, нейтрофилами, эндотелиальными клетками и лимфоцитами.

Среди множества метаболических нарушений особого внимания заслуживает окислительный стресс (ОС), который формирует аутоповреждение при ССВР. Для ОС характерна неконтролируемая генерация АФК, оказывающих повреждающее действие на все биологические структуры. Для больных в КС наиболее значимой является окислительная модификация белков и липидов.

В связи с вышеизложенным, мы изучили влияние ОС на белки и липиды у больных в КС с ССВР.

В процессе работы обследовали 35 больных в КС, обусловленных разлитым гнойным перитонитом и деструктивным панкреатитом. У всех больных был диагностирован ССВР в соответствии с общепринятыми критериями. Выраженность ОС оценивали по перикисному окислению липидов, для чего определяли уровень малонового диальдегида (МДА) и окислительной модификации белков — по содержанию карбониллов и SH-групп в белках. Исходные показатели окислительной модификации белков у всех больных превышали нормальные значения, в то время как уровень МДА был близок к норме. В дальнейшем уровень МДА и карбониллов в белках повышался и достигал максимальных значений на 3–5 сут. заболевания, а содержание SH-групп в белках было в эти сроки минимальным и составляло: уровень МДА — $3,56 \pm 0,7$ мкМ/л ($n = 1,71 \pm 0,3$), содержание карбонильных групп в белках — $2,37 \pm 0,31$ нмоль/мг ($n = 0,72 \pm 0,15$), концентрация SH-групп в белках — $0,264 \pm 0,084$ мМ ($n = 0,056$). В дальнейшем у больных с благоприятным исходом прослеживалась тенденция к нормализации исследуемых показателей. Кроме того, наблюдали зависимость между тяжестью ССВР и выраженностью ОС. Считаем, что ОС является важным компонентом формирования ССВР у хирургических больных в КС.

Действие низкомолекулярных продуктов деградации фибринового сгустка на клетки PC12

Ю.И. Петрова, Т.Н. Платонова, Е.Н. Калашник, М.В. Скок
Институт биохимии им. А.В. Палладина НАН Украины, Киев

Заживление ран после травмы или хирургического вмешательства сопровождается регенерацией нервов через новообразованную ткань. Известно, что продукты деградации фибринового сгустка, который образуется в результате травмы, являются биологически активными веществами, которые могут влиять на нервные клетки. Целью работы было изучение влияния продуктов деградации фибринового сгустка на пролиферацию, адгезию и дифференцировку нейроноподобных клеток феохромоцитомы PC12. Оказалось, что клетки PC12 инициировали плазминовый тип гидролиза сгустка посредством секреции активатора плазминогена тканевого типа. Низкомолекулярные фрагменты деградации фибринового сгустка (НМФ, 26 кДа и ниже), а не фибринопептиды А и В или α C-домен, стимулировали пролиферацию клеток PC12, способствовали, подобно фактору роста нервов и интерлейкину 6, росту нейритов и вызывали усиление экспрессии никотинового ацетилхолинового рецептора. В отличие от НМФ, суммарные высокомолекулярные продукты деградации фибринового сгустка (50 кДа и выше), и очищенные D-, DD- и E-фрагменты фибрина подавляли пролиферацию клеток PC12 и не влияли на их дифференцировку. D- и E-фрагменты связывались со специфическим ФИТЦ-рецептором на поверхности клеток PC12. С использованием ФИТЦ-меченых D-фрагментов было установлено, что каждая клетка содержит

приблизительно 1×10^6 мест связывания этого фрагмента, константа сродства связи составляет $8,12 \times 10^6$ М⁻¹. Связывание было Арг-Гли-Асп-зависимым. В отличие от НМФ, D- и E-фрагменты усиливали адгезию клеток PC12 к пластику. Исходя из полученных данных, можно сделать вывод, что продукты деградации фибринового сгустка разного молекулярного веса влияют на клетки PC12 противоположным образом. D-, DD- и E-фрагменты влияют на молекулы адгезии, тогда как НМФ оказывают действие, подобное ростовым факторам.

Влияние клеток памяти на пролиферацию наивных клеток в ответе на аллоантиген

Е.Л. Побезинская, Л.А. Побезинский, Т.С. Терещенко, В.Н. Петрищев,
Д.Б. Казанский

Российский онкологический научный центр РАМН, Москва

Феномен аллореактивности обусловлен высокой частотой клонов, отвечающих на аллельные формы молекул гистосовместимости. Поэтому, наряду с использованием животных с трансгенным T-клеточным рецептором, этот феномен может быть использован для сравнения функциональных характеристик наивных T-клеток и клеток памяти. Для получения клеток памяти, специфичных к молекуле H-2K^b, мышей R101 (K^dQ^dD^b) иммунизировали внутрибрюшинно клетками тимомы EL4 (K^bD^b). Через два месяца после иммунизации можно было обнаружить селективную пролиферацию клеток памяти в ответ на аллогенные стимуляторы C57Bl/6 (K^bD^b), подвергнутые тепловому шоку. Ранее нами было показано, что как поликлональная популяция клеток памяти, так и отдельные клоны клеток памяти в ответе на аллогенные стимуляторы, обработанные митомицином С, продуцируют супрессорные цитокины, такие, как IL-10 и TGF β , но не IL-2, необходимый для пролиферации наивных T-клеток. В связи с этим, возникло предположение, что клетки памяти подавляют пролиферацию наивных клеток. Чтобы проверить эту гипотезу, использовали мышей C57Bl/10 (K^bD^b), которые экспрессируют GFP (green fluorescent protein) под активным промотором. Все клетки таких мышей флуоресцируют в зелёной области спектра, что позволяет отличать эти клетки от клеток «незелёных» мышей. Мышей C57Bl/10 и GFP иммунизировали внутрибрюшинно клетками мастоцитомы P815 (K^dD^d), в результате чего образовывались клетки памяти, специфичные к продуктам МНС гаплотипа H-2^d. Через два месяца после иммунизации выделяли спленоциты от «зелёных» мышей, смешивали со спленоцитами от «незелёных» неиммунных мышей в соотношении 1:1 и анализировали, какие лимфоциты пролиферируют в ответ на аллогенные стимуляторы мышей B10.D2 (K^dQ^dD^d), обработанные митомицином С. Для этого на 4-й день клетки культуры окрашивали моноклональными антителами к молекулам CD4 и CD8 и анализировали на проточном цитофлуориметре. Обнаружено, что в этих условиях происходит значительное увеличение доли T-клеток CD8⁺, экспрессирующих GFP, т.е. клеток памяти. Доля «незелёных» наивных клеток CD8⁺ увеличивалась незначительно, в то время как доля наивных клеток CD4⁺ не изменилась. Это говорит о том, что клетки памяти полностью ингибируют пролиферацию наивных клеток CD4⁺ и частично подавляют пролиферацию наивных клеток CD8⁺. Данные были подтверждены в реципрокных экспериментах, в которых использовались наивные лимфоциты с экспрессией GFP и клетки памяти, не экспрессирующие трансген. Для независимого подтверждения полученных результатов спленоциты иммунных и неиммунных мышей C57Bl/10 окрашивали красителем CFSE, позволяющим проследить деление клеток в смешанной культуре лимфоцитов с аллогенными стимуляторами. Оказалось, что в популяции наивных клеток в ответ на аллогенную стимуляцию пролиферируют как лимфоциты CD4⁺, так и CD8⁺. Однако, в популяции клеток памяти наблюдается пролиферация только клеток CD8⁺, тогда как ответ наивных клеток CD4⁺ угнетается в присутствии клеток памяти. Таким образом, при ответе на антиген ответ наивных клеток находится под жестким контролем клеток памяти. По всей видимости, этот механизм позволяет избежать интерференции первичных и вторичных ответов.

Данная работа выполнена при поддержке РФФИ (грант №02-04-49042) и программы «Вакцины нового поколения и медицинские диагностические системы будущего».

Замена корцептора CD4 на CD8 приводит к сохранению клеток с аутореактивным TCR при негативной селекции

Л.А. Побезинский, Е.Л. Побезинская, Т.С. Терещенко, Д.Б. Казанский
Российский онкологический научный центр РАМН, Москва

Толерантность к «своему» формируется в результате процессов негативной селекции Т-клеток в тимусе. Недавно было установлено, что источник клеток CD8⁺ в тимусе гетерогенен, т.е. часть клеток CD8⁺ формируется из клеток с высокой экспрессией обоих корцепторов CD4^{high}CD8^{high} (DP), на другой же части сначала снижается экспрессия корцептора CD8 (стадия CD4^{high}CD8^{low}), после чего эти клетки становятся CD8⁺. Данные предпосылки позволяют предположить, что изначально большая часть клеток DP встает на путь дифференцировки клеток CD4⁺. Однако, на промежуточном этапе (стадия CD4^{high}CD8^{low}) часть клеток с рецепторами (TCR), способными к высокоаффинному взаимодействию с собственными молекулами МНС класса II, подвергается негативной селекции, приводящей не к гибели, а к замене корцептора CD4 на CD8. Это, с одной стороны, предотвращало бы выход из тимуса и активацию на периферии аутоиммунных Т-клеток молекулами МНС класса II. С другой стороны, этот процесс позволил бы организму избежать гибели клеток с успешно реаранжированным TCR и попытаться «проскочить» негативную селекцию таких Т-клеток на молекулах МНС класса I. Согласно этой гипотезе, на периферии могут находиться Т-клетки CD8⁺, чей TCR способен реагировать как с молекулами МНС класса I, так и МНС класса II в зависимости от экспрессии соответствующего корцептора. Чтобы проверить данную гипотезу, Т-клетки из лимфатических узлов мышей C57Bl/10 активировали спленоцитами мышей bm3, несущими мутантную молекулу МНС класса I. Из образовавшихся blastов CD8⁺ получили Т-гибридомы, используя в качестве партнера клетки тимомы BW5147, трансфецированной молекулой CD4. Специфичность гибридом оценивали по секреции IL-2, количество которого в супернатантах стимулированных культур определяли по выживанию клеток линии CTLL-2, зависимой от IL-2. Около 30 гибридом из проанализированных 200 распознают сингенные спленоциты C57Bl/10 и не распознают спленоциты мышей bm12, экспрессирующие мутантную молекулу МНС класса II. Ответы всех полученных гибридом блокируются антителами к молекуле A^b и корцептору CD4. Полученные гибридомы не обладают реактивностью к продуктам MIs, поэтому данную активацию нельзя рассматривать как неспецифическую реакцию на суперантигены эндогенных провирусов, ассоциированных с молекулами МНС класса II. Эти наблюдения способны во многом изменить существующие представления о негативной селекции Т-клеток в тимусе, учитывая, что пул периферических Т-клеток CD8⁺ экспрессирует потенциально аутореактивные TCRs, способные к распознаванию собственной молекулы МНС класса II. Это может быть объяснено тем, что негативная селекция клеток на стадии CD4^{high}CD8^{low} приводит к замене корцептора, а не их гибели.

Данная работа выполнена при поддержке РФФИ (грант №02-04-49042) и программы «Вакцины нового поколения и медицинские диагностические системы будущего».

Цитокины как регуляторы активности цитохром Р450-зависимых монооксигеназ при воспалении

С.В. Сибиряк

Отдел клинической и экспериментальной иммунологии Российского центра глазной и пластической хирургии МЗ РФ, Уфа

Цитохром Р450-зависимые монооксигеназы (гемопротеид цитохром Р450 (ЦхР450) и сопряженная с ним электронно-транспортная система) осуществляют внедрение активированного кислорода непосредственно в молекулу субстрата, что при-

водит к образованию окисленного, более гидрофильного продукта и молекулы воды. В организме млекопитающих цитохром Р450-зависимые монооксигеназы выполняют две важнейшие функции. Во-первых, это окислительная биотрансформация (биосинтез или биодеградация) эндогенных липофильных молекул-эндобиотиков (стероидов, арахидонатов, ретиноидов), вторых, биотрансформация поступающих извне химических соединений-ксенобиотиков, которые не являются участниками нормального биохимизма клеток, с целью их элиминации. В процессе монооксигенирования ЦхР450 способен к генерации активных форм кислорода, оксида азота и является одной из основных прооксидантных систем клетки. Максимально эта ферментная система экспрессирована в гепатоцитах, что обеспечивает наиболее активное участие печени в биотрансформации ксенобиотиков. В надпочечниках и половых железах в основном экспрессированы изоформы, участвующие в биосинтезе стероидных гормонов, в почках — изоформы, участвующие в биотрансформации ксенобиотиков и витамина D и т. д. Иммунокомпетентные клетки также характеризуются высоким уровнем экспрессии некоторых изоформ ЦхР450.

При развитии бактериальных, вирусных инфекций, протозойных инфекциях, при иммунизации животных различными антигенами, в условиях фармакологической стимуляции иммунитета различными препаратами и соединениями возникает снижение уровня ЦхР450 и (или) угнетение монооксигеназной активности в гепатоцитах и в других тканях. Этот эффект реализуется опосредованно через IFN α и IFN β и провоспалительные цитокины — TNF, IL-1, IL-6 — и связан в первую очередь с активацией макрофагов. Последствием иммунологически опосредованной депрессии активности ЦхР450 является изменение биотрансформации самого широкого круга эндогенных биорегуляторных соединений и ксенобиотиков (в том числе и лекарств). Цитокины непосредственно ингибируют транскрипцию генов ЦхР450 (причем показано наличие сайтов связывания некоторых цитокинов в регуляторных участках генов, кодирующих изоформы ЦхР450), реципрокно ингибируют транскрипцию при активации других генов (с-тус), угнетают активность NF κ B. Опосредованная TNF индукция iNOS и образование оксида азота играет также немаловажную роль, поскольку оксид азота образует комплекс с железом гема и блокирует каталитическую активность ЦхР450. Активные формы кислорода, образующиеся при активации мембраносвязанных НАДФ⁺H-оксидаз, ингибируют ЦхР450 на посттрансляционном уровне. Снижая активность монооксигенирования при воспалении, цитокины снижают риск гипероксидации в тканях, что необходимо для защиты редокс-чувствительных регуляторных белков. Опосредованно — через изменение кинетики биотрансформации эндогенных липофильных биорегуляторных молекул (холестерина, стероидных гормонов, арахидонатов, витамина D) — цитокины осуществляют модуляцию клеточной активности и обеспечивают регуляцию воспаления на уровне других систем организма.

Изучение иммуномодулирующей активности рекомбинантного TNF β на моделях иммунного воспаления

Г.М. Сысоева, В.А. Факина, В.И. Масычева, Е.Д. Даниленко,
Н.М. Пустошилова

Научно-исследовательский конструкторско-технологический институт биологически активных веществ ГНЦ вирусологии и биотехнологии «Вектор», Бердск, Новосибирская область

Целью данной работы являлось исследование влияния рекомбинантного человеческого TNF β (рчTNF β) на развитие реакции ГЗТ и ГЗТ-опосредованное иммунное воспаление — адьювантный артрит (АА). В эксперименте использовали линейных мышей, различающихся по чувствительности к развитию воспалительной реакции: СВА и С57Bl/6. АА индуцировали подкожным введением полного адьюванта Фрейнда (ПАФ).

Сравнительная оценка влияния рчTNF β на выраженность реакции ГЗТ к Т-зависимому антигену (эритроцитам барана) показала, что введение препарата не приводило к изменению индекса реакции у мышей линии СВА, в то время как у мышей линии С57Bl/6 рчTNF β усиливал ее интенсивность. Гидрокор-

тизон, известный своей способностью подавлять развитие местного воспалительного процесса, был использован нами в качестве агента, модифицирующего эффекторную фазу клеточного иммунного ответа. Показано, что рчTNF β усиливал иммунный ответ в условиях ингибирования его гидрокортизоном (1,0 мг/мышь) лишь у мышей с повышенной способностью к развитию воспалительной реакции. Инъекция ПАФ вызывала развитие более интенсивной воспалительной реакции у мышей линии С57Bl/6 по сравнению с мышами СВА. Показатель величины артрита у высокочувствительных животных был в 1,7 раза больше, чем у устойчивых к развитию АА мышей. Препарат рчTNF β усиливал воспалительный процесс у мышей линии С57Bl/6 и не влиял на величину этого показателя у мышей СВА. Увеличение размеров артритного узла составляло 22 и 19 % при введении рчTNF β в дозе 10³ и 10⁴ Е/мышь соответственно. Усиление воспалительной реакции под действием препарата сопровождалось повышением метаболической активности перитонеальных макрофагов этих животных. Процент НСТ⁺-макрофагов при введении препарата мышам линии С57Bl/6 возрос более чем в 2 раза, в то время как у мышей линии СВА их количество оставалось на уровне контрольных показателей.

Представленные данные позволяют сделать вывод о том, что интенсивность модулирующего действия рекомбинантного человеческого TNF β на развитие иммунного воспаления, опосредованного реакцией ГЗТ, зависит от уровня иммунореактивности животного и связано, возможно, со стимулирующим влиянием препарата на окислительный метаболизм макрофагов.

Слабость пролиферативного ответа Т-лимфоцитов части новорожденных вызвана продукцией интерлейкина 10

В.Ю. Талаев, И.Е. Рубцова, О.Н. Бабайкина, И.Е. Лебедева, Е.А. Грачева
Нижегородский НИИ эпидемиологии и микробиологии им. акад. И.Н. Блохиной
МЗ РФ, Нижний Новгород

Ранее нами было показано, что тяжелое клиническое состояние новорожденных маркируется двумя отклонениями в функциональных свойствах лимфоцитов: слабостью пролиферативного ответа Т-клеток на активацию и повышенным уровнем апоптоза Т-лимфоцитов. В данной работе исследовали не связанные с апоптозом причины подавления пролиферативного ответа Т-клеток новорожденных. Объектом исследования были культуры мононуклеарных клеток пуповинной крови детей группы риска, которую формировали по наличию патологий в развитии беременности. Для активации Т-лимфоцитов использовали моноклональные антитела (МКА) к молекуле CD3. Продукцию цитокинов в культуре подавляли с помощью натриевой соли фосфата дексаметазона. Для компенсации дефицита ростовых факторов использовали введение в культуру rIL-7 — наиболее эффективного фактора роста для Т-лимфоцитов новорожденных. Активность IL-10, продуцирующегося в культурах, блокировали МКА к этому цитокину. Показано, что дексаметазон, подавляющий пролиферацию активированных Т-клеток без дополнительных стимуляторов, в присутствии IL-7 парадоксальным образом усиливал пролиферативный ответ Т-клеток на активацию у 13 из 24 новорожденных. По-нашему мнению, в основе такого «ростового» эффекта дексаметазона лежит его способность подавлять продукцию не только цитокинов, стимулирующих рост лимфоцитов, но и факторов, подавляющих пролиферацию Т-клеток, и этот эффект проявлялся в условиях компенсации дефицита ростовых цитокинов введением в культуру IL-7. Следует отметить, что в группе детей с наличием «ростового» действия дексаметазона оказались сосредоточены дети, находящиеся в наиболее тяжелом клиническом состоянии, и большинство детей этой группы были переведены из роддомов в специализированные отделения детских больниц для стационарного лечения. Одним из факторов, способных угнетать пролиферацию Т-клеток, является IL-10. Показано, что МКА, блокирующие активность IL-10, достоверно увеличивали слабый пролиферативный ответ Т-клеток у 2 из 10 обследованных недоношенных новорожденных, находящихся в тяжелом и среднетяжелом клиническом состоянии. У 1 из 10 детей эти МКА вызывали недостоверное усиление про-

лиферации активированных Т-клеток без дополнительных стимуляторов, но индуцировали шестикратное усиление пролиферации активированных Т-клеток в присутствии IL-7 — по сравнению с соответствующим контролем. По-видимому, у данного ребенка слабость пролиферации Т-клеток была связана как с гиперпродукцией IL-10, так и с конститутивным дефицитом ростовых цитокинов.

Таким образом, слабость пролиферативного ответа Т-лимфоцитов у части новорожденных связана с продукцией растворимых факторов, угнетающих пролиферацию. Продукция этих факторов подавляется дексаметазоном. Одним из этих факторов является IL-10.

Работа поддержана РФФИ, проект № 01-04-48209.

Роль GM-CSF, продуцируемого эпителиальными клетками тонкого кишечника, в регуляции гемо- и энтеропоэза

В.В. Темчура¹, С.В. Сенников¹, В.А. Труфакин², В.А. Козлов¹

¹ГУ НИИ клинической иммунологии СО РАМН, Новосибирск; ²ГУ НИИ физиологии СО РАМН, Новосибирск

Филогенетически кишечник является первым локализованным органом гемопоэза. При этом наблюдается не только структурное сходство гемопоэза и энтеропоэза, но и общность гуморальных механизмов регуляции функциональной активности стволовых клеток данных систем. Методом электрохемилюминесценции нами было показано, что интестинальные эпителиальные клетки (ИЭК) мыши продуцируют GM-CSF. При разделении кондиционной среды (КС) от ИЭК на фракции (Фр) с различным молекулярным весом наличие GM-CSF было обнаружено во Фр1 (> 30 кДа) и Фр2 (10–30 кДа), что связано с различной степенью гликозилированности белка.

Изучение влияния GM-CSF на процессы энтеропоэза проводили на модели оценки включения ³H-тимидина клетками крипт *in vitro*. Было показано, что в зависимости от концентрации GM-CSF оказывало оппозитное влияние на пролиферативную активность клеток крипт, т.е. высокое содержание (около 5 нг/мл) GM-CSF в культуральной среде после добавления КС и Фр1 приводило к подавлению пролиферативного ответа, в то время как низкий уровень (около 1 нг/мл), обусловленный добавлением Фр2, вызывало стимуляцию. Предварительная инкубация КС и ее фракций с блокирующими антителами (АТ) к GM-CSF полностью отменяла эти эффекты. Данные результаты были воспроизведены в экспериментах с использованием рекомбинантного мышинного GM-CSF. Ранее нами было показано присутствие в кишечном эпителии клеток-предшественников гемопоэза, образующих селезеночные колонии на 8-е сут. (КОЕс-8). В связи с этим изучали действие КС и ее фракций на функциональную активность КОЕс-8 с использованием методов экзогенного селезеночного колониеобразования и клеточного самоубийства. Было показано, что культивация клеток костного мозга мышей-доноров в среде, содержащей КС, Фр1 или Фр2, приводила к достоверному увеличению пролиферативной и колониеобразующей активности КОЕс-8 по сравнению с соответствующими показателями в контрольной группе. Для фактического определения роли GM-CSF, продуцируемого ИЭК, инкубировали Фр1 и Фр2 с биотинилированными поликлональными АТ, с последующим удалением конъюгатов стрептавидиновыми бусами. Данная процедура отменяла стимулирующие эффекты GM-CSF содержащих фракций. Также нами было оценено влияние КС на морфологические параметры гемопотических колоний в полувязкой метилцеллюлозной среде. Предварительная инкубация клеток костного мозга в присутствии КС приводила к достоверному увеличению колониеобразования на 10-е сут. и вызывала достоверные изменения процентного соотношения числа эритроидных и гранулоцитарно-макрофагальных колониеобразующих единиц. Таким образом, полученные нами данные говорят об участии GM-CSF, продуцируемого ИЭК, как в процессах аутокринной регуляции пролиферативной активности клеток регенеративной зоны крипт, так и в паракринном модулирующем влиянии на клетки-предшественники гемопоэза.

Влияние IL-1Ra на активацию лимфоцитов в культуре мононуклеаров периферической крови при непереносимости нестероидных противовоспалительных препаратов

Л.Д. Титова¹, И.Г. Сидорович¹, А.С. Симбирцев²

¹ГНЦ Институт иммунологии Минздрава РФ, Москва; ²ГНЦ НИИ особо чистых биопрепаратов, С.-Петербург

При непереносимости нестероидных противовоспалительных препаратов (НПВП) патогенез реакций на медикамент имеет несколько механизмов: основную роль отводят продуктам метаболизма арахидоновой кислоты — лейкотриенам и IL-1, которые при блокаде циклооксигеназ (COX1 и COX2) и при наличии в организме активированных лимфоцитов (инфекции, аллергические состояния, аутоиммунные процессы) могут инициировать реакции гиперчувствительности. Такие реакции развиваются также при извращенном метаболизме лекарственных препаратов в печени (токсическая печень, ферментопатия — эти изменения обратимы), и возникают иммунные реакции на продукты этого метаболизма. Генетический полиморфизм системы цитохромов P450, которые участвуют в оксидации ксенобиотиков, может быть причиной появления иммуногенных метаболитов, на которые развиваются истинные аллергические реакции. Однако во всех этих механизмах развития гиперчувствительности к НПВП участвует провоспалительный цитокин IL-1, а при лейкотриеновом механизме он играет ведущую роль, так как отсутствует его природный антагонист PGE₂. Для ингибирования IL-1 в опытах использовали рекомбинантный препарат рецепторного антагониста IL-1β (IL-1Ra), который проходит клинические испытания как противовоспалительный препарат. Проводили исследование активации лимфоцитов медикаментами в культуре мононуклеарных клеток периферической крови цитофлуориметрическим методом с использованием моноклональных антител к мембранным молекулам активации лимфоцитов. Статистическую обработку результатов проводили с помощью критерия Уилкоксона. Обследовали пациентов с диагнозом: бронхиальная астма, атопическая форма, гиперчувствительность к НПВП. Экспрессия молекул активации лимфоцитов (CD69) при добавлении в культуру клеток причинных медикаментов у пациентов с гиперчувствительностью к аспирину, анальгину и вольтарену была на уровне показателя стимуляции фитогемагглютинином в 14 из 23 проб. При внесении в культуру клеток пациентов с гиперчувствительностью к НПВП 20 мкг/мл рецепторного антагониста IL-1β отмечали достоверное снижение экспрессии молекул CD69 в пробах с повышенным ответом на анальгин, аспирин и вольтарен ($p = 0,048$). Полученные результаты могут подтверждать противовоспалительное действие IL-1Ra при гиперчувствительности к НПВП.

C-реактивный белок ингибирует сигналинг от рецептора интерлейкина 2

Г.Б. Турчинович, П.Г. Назаров

ГУ НИИ экспериментальной медицины РАМН, С.-Петербург

C-реактивный белок (CRP) — основной острофазовый реактант человека. Его концентрация резко возрастает в ходе реакции острого воспаления, иногда в сотни раз по сравнению с нормальным уровнем. Помимо таких давно известных свойств CRP, как связывание фосфорилхолина на поверхности различных бактерий с последующей активацией каскада компонентов по классическому пути и опсонизацией, было показано, что этот белок способен модулировать эффекты некоторых цитокинов. Например, CRP эффективно ингибирует эффекты интерлейкина 8 на нейтрофилы человека. В этой работе мы выяснили, что CRP отменяет митогенное действие рекомбинантного интерлейкина 2 на мононуклеары периферической крови человека. Такие лиганды CRP, как фосфорилхолин и гепарин, не влияли на результат экспериментов. Более того, CRP не оказывал никакого влияния на пролиферацию, вызванную фитогемагглютинином. Близкий гомолог CRP — сывороточный P-компонент амилоида — достоверно не ингибировал эффект интерлейкина 2.

Исходя из полученных результатов, мы можем заключить, что CRP ограничивает развитие иммунного ответа в кровотоке, таким образом предотвращая развитие потенциальной аутоиммунной реакции.

Работа поддержана грантом РФФИ № 01-04-49615.

Биохимические и клеточные механизмы влияния тритерпеноидов на воспаление

Б.А. Фролов, А.В. Кириллова, Т.В. Панфилова
Оренбургская государственная медицинская академия

Терпеноиды (или изопреноиды) представляют собой самый многочисленный класс низкомолекулярных соединений, молекулы которых построены из разветвленных C₅-единиц. Они объединяются в один класс по биогенетическому признаку, образуясь из мевалоновой кислоты. Тритерпеноиды (C₃₀H₄₈), один из подклассов изопреноидов, в настоящее время служат объектом глубокого изучения в связи с обнаружением у них различных биологических свойств, используемых в медицине. Среди этих свойств тритерпеноидов (ТТП) наиболее изученным является их противовоспалительное действие, которое проявляют как сами тритерпены, так и терпеновые сапонины (гликозиды), где пентациклические тритерпены выступают в качестве агликановой части молекул (сапогенинов). Противовоспалительный эффект ТТП убедительно продемонстрирован на различных моделях и, по данным литературы, обусловлен широким спектром биохимических и клеточных механизмов. Среди них: 1) цитопротекторный эффект ТТП, которые в силу особенностей своей химической структуры могут встраиваться в липидный бислой мембран, повышая резистентность клеток к повреждению; 2) прямое стероидоподобное влияние ТТП на воспалительный процесс, а также опосредованное влияние, реализуемое через индукцию образования глюкокортикоидов и уменьшение их распада; 3) антикомплементарная активность, проявляющаяся в отношении классического пути активации системы комплемента, но не затрагивающая альтернативный путь; 4) редукция провоспалительных эффектов H₂O₂ и брадикинина; 5) ограничение дозозависимо индуцированной (анти-IgE) дегрануляции тучных клеток и, как следствие этого, снижение высвобождения гистамина; 6) подавление миграционной способности нейтрофилов; 7) ингибирование сериновых протеаз (трипсина и химотрипсина); 8) антагонистическое влияние на эндотелиновые рецепторы, обуславливающее отмену повышения свободного кальция в цитозоле клеток, стимулированных убикватерным эндотелином 1; 9) снижение продукции оксида азота (стимулированной IFN γ , TNF α , IL-1 α) через подавление активности индуцибельной NO-синтазы (iNO-S); 10) торможение высвобождения арахидоновой кислоты путем угнетения фосфолипазы A₂ (ФЛА₂). Последнее может определяться снижением активации брадикинином B₂-рецепторов, запускающих после связи с лигандом фосфоинозитидный путь с активацией ФЛА₂, а также прямым ингибированием активности фермента. Такой эффект установлен для тетрациклических ТТП, реализующих свое влияние через связывание боковой цепи с каталитически активным центром ФЛА₂; 11) угнетение ключевых ферментов метаболизма арахидоновой кислоты, COX-2, 5-липоксигеназы, а также «профильных» ферментов, участвующих в образовании ее определенных метаболитов. Конечным результатом является снижение продукции и угнетение высвобождения PGE₂, LTC₄ и TXB₂, играющих существенную роль в развитии не только банального, но и аллергического воспаления; 12) ингибирование активности протеинкиназ A и C, регулирующих внутриклеточные метаболические процессы, ионный транспорт, трансдукцию сигналов и экспрессию мишеневых генов. Выяснение зависимости между конкретными механизмами противовоспалительного действия ТТП и особенностями их химического строения не позволяет прийти к однозначной оценке. Для ТТП урсанового и олеанового рядов не определена значимая роль таких факторов, как гидроароматическая природа, принадлежность к правовращающим изомерам, оксигенация и пентациклическая ненасыщенность. Однако, приводятся данные и в пользу такой зависимости — при проявлении ТТП антикомплементарной активности или способности ингибировать NO-синтазу.

Системное воспаление как иммунопатобиологический феномен

В.А. Черешнев, Е.Ю. Гусев

Екатеринбургский филиал Института экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН

С позиции общей патологии, воспаление есть «ключевой» общепатологический и одновременно адаптационно-приспособительный биологический процесс, обусловленный реакцией защитных механизмов организма на местное повреждение. Именно на местном уровне, ассоциированном непосредственно с очагом воспаления, мы видим внешние, атрибутивные его признаки: гиперемия, локальное повышение температуры, отек, боль, нарушение функции соответствующего органа. В их основе лежат базисные молекулярно-клеточные программные механизмы воспаления, а именно: морфо-функциональная перестройка эндотелиоцитов посткапиллярных венул и коагуляция в них крови, активация комплемента, кининогенез, вазодилатация артериол, дегрануляция мастоцитов, адгезия, трансэндотелиальная миграция и активация лейкоцитов с последующим развитием феноменов оксидантного стресса и «протеиназного взрыва» фагоцитов, как и других частных флогенных механизмов, характерных для очага воспаления. Все эти процессы можно условно отнести к воспалительной реактивности 1-го (местного) уровня.

Накопление провоспалительных цитокинов в крови и реализации их регуляторных эффектов в настоящее время рассматриваются с позиции синдрома системного воспалительного ответа (Bone R. et al., 1991) — systemic inflammatory response syndrome (SIRS). При этом задействование механизмов системной реактивности возможно только при выраженном местном воспалении или его барьерной несостоятельности. Так, в норме концентрация отдельных провоспалительных цитокинов в крови обычно не превышает 5–20 пкг/мл, а при развитии SIRS может возрастать в 5–10 раз, а иногда и более того. Различные проявления SIRS можно отнести к воспалительной реактивности 2-го (системного) уровня, характерного для многих классических вариантов воспалительного процесса.

Иногда альтерация может приобретать системный характер, и это обстоятельство в корне меняет суть воспалительного процесса в целом. Именно в этом случае возникает состояние организма, которое можно обозначить понятием «системное воспаление». В качестве факторов системного повреждения, по-видимому, могут выступать любые грубые нарушения гомеостаза. При этом мы выделяем три основных признака системного воспаления:

- оно развивается в ответ на системную альтерацию;
- характеризуется генерализованным задействованием воспалительных механизмов не только 2-го, но и базовых механизмов 1-го уровня;
- провоспалительные механизмы теряют свою протективную основу (локализация факторов альтерации) и сами становятся главной движущей силой патологического процесса.

Последнее относится не только к механизмам 1-го уровня (хотя, прежде всего, именно к ним), но и 2-го, поскольку системная реакция иммунонейроэндокринного комплекса здесь будет развиваться по варианту дистресса.

Учитывая вышесказанное, можно сформулировать следующее определение: «Системное воспаление — это мультисиндромный, фазоспецифичный патологический процесс, характеризующийся тотальной воспалительной реактивностью микрососудов, плазменных и клеточных факторов крови, соединительной ткани, а на заключительных этапах и микроциркуляторными расстройствами в жизненно важных органах в ответ на системный характер альтерации».

Цитокиновая регуляция иммунного старения

Н.В. Шабашова, Е.В. Фролова

Медицинская академия последипломного образования, С.-Петербург

В современном мире с каждым годом увеличивается количество людей пожилого и старческого возраста. Поэтому гериатрическая патология занимает все большее место в клинической

практике. В частности, в этом возрасте увеличивается частота инфекционных и онкологических заболеваний из-за возрастных изменений в иммунной системе. Существует даже такой термин, как «иммунное старение», который отражает процессы дисрегуляции в иммунном ответе. Однако, окончательно не ясно, что лежит в основе изменений — возрастная перестройка всех систем организма человека или все накопившиеся в течение жизни заболевания.

Цель настоящей работы заключалась в сравнении особенностей иммунной системы в разных возрастных группах условно здоровых людей. Под наблюдением было 105 человек (37 мужчин и 68 женщин): 1-я группа (1 гр.) — 15 человек от 18 до 38 лет; 2-я группа (2 гр.) — 28 человек от 40 до 50 лет; 3-я группа (3 гр.) — 40 человек от 51 года до 59 лет и 4-я группа (4 гр.) — 22 человека от 60 до 74 лет. Все обследованные люди не страдали серьезными соматическими или эндокринными заболеваниями. У них не было хронических инфекционных, аутоиммунных или аллергических болезней. На момент обследования изменения кардиоваскулярной, гастроинтестинальной или опорно-двигательной систем были в стадии ремиссии. Клеточный состав лимфоцитов крови исследовали с помощью моноклональных антител («Сорбент») в тесте непрямои иммунофлюоресценции. Уровень IgE изучали иммуноферментным методом. Функциональную активность нейтрофилов учитывали в НСТ-тесте, а NK-клеток — по их цитопатогенному действию на клетки-мишени К-562. Интерфероновый статус исследовали микрометодом в культуре фибробластов М-19 по задержке цитопатогенного действия вируса везикулярного стоматита (штамм Индиана). Уровни иммуноглобулинов определяли по Манчини, а ЦИК — по осаждению полиэтиленгликолем. Результаты исследований обработаны статистически по методу Стьюдента. В качестве группы сравнения для всех остальных была выбрана 1 гр. Установлено, что по мере старения снижается число лейкоцитов за счет нейтрофилов (обратная корреляция с возрастом $r = -0,41$) при повышении их функциональной активности, очевидно, вследствие замедления выведения эндогенных стимуляторов, таких, как ЦИК. Уровни ЦИК прямо коррелировали с возрастом ($r = 0,44$). В 3 и 4 гр. выявлены наибольшие уровни IgG, низкое содержание IFN α (231 и 328 vs 450 ЕД/мл в 1 гр.) и IFN γ (20 и 25 vs 32 ЕД/мл в 1 гр.), сниженная функциональная активность NK-клеток (36 и 35 % vs 47 % в 1 гр.) по сравнению с первыми двумя группами. Причем цитопатическая активность NK-клеток на клетки-мишени имела с увеличением возраста обратную корреляцию ($r = -0,43$). На этом фоне установлено повышение уровня IgE (от 15,0 \pm 3,2 в 1 гр. до 99,7 \pm 21,2 ЕД/мл в 3 гр.) и выявлена обратная корреляция IgE с уровнем IFN γ ($r = -0,40$). Следовательно, полученные результаты указывают на постепенную перестройку иммунного ответа — в сторону дифференцировки Th0 в Th2, и это может объяснить снижение противовирусной резистентности, которая наблюдается в этих группах.

У обследованных в возрасте 51–60 и 60–74 лет выявлено снижение синтеза регуляторных цитокинов, влияющих на активность клеточных типов иммунного ответа и противовирусную резистентность. Постепенное нарастание выявленных изменений свидетельствует о необходимости иммунореабилитации в фазу эндокринной и иммунной перестройки организма у людей в период перехода к пожилому возрасту.

Влияние введения эритропоэтина на экспрессию генов цитокинов (IL-1 β , IL-1R, EPO-R) в лимфоидной, гемопоэтической и нервной тканях и их функциональные параметры у мышей (CBA \times C57Bl)F1

Е.В. Якушенко, А.Ф. Повещенко, Е.В. Маркова, Н.А. Короткова, В.В. Абрамов, В.А. Козлов

ГУ НИИ клинической иммунологии СО РАМН, Новосибирск

Известно, что цитокины являются медиаторами различных процессов не только в иммунной и гемопоэтической системах, но также опосредуют процессы пролиферации, дифференцировки и функционирования клеток других систем, в том числе и нервной ткани.

Целью данной работы было исследование характера изменений экспрессии одних и тех же генов (IL-1 β , IL-1R, EPO-R) в лимфоидной, гемопоэтической и нервной тканях после введения рекомбинантного человеческого эритропоэтина (ЕРО). ЕРО использовался в качестве фактора, стимулирующего гемопоэз, а также иммунопоэз и процессы функциональной активности в нервной ткани, как показано в ряде последних работ. ЕРО вводили в дозе по 10 ед. 3 раза через день подкожно. мРНК генов IL-1 β , IL-1R, EPO-R выделяли из клеток селезенки, костного и головного мозга мышей (СВА \times С57В1)F1 через 1 сут. после последнего введения ЭП. Определение уровня экспрессии мРНК генов IL-1 β , IL-1R, EPO-R проводили с использованием метода RT-PCR.

Итак, нами было показано, что введение ЕРО: 1) в клетках селезенки увеличивает уровень экспрессии всех указанных генов; 2) в костном мозге не оказывает достоверного влияния на уровень экспрессии генов IL-1 β и его рецептора IL-1R, но стимулирует уровень экспрессии гена рецептора ЕРО (ЕРО-R); 3) в головном мозге подавляет уровень экспрессии генов IL-1 β и IL-1R и стимулирует экспрессию гена ЕРО-R. Известно, что многие цитокины, в том числе IL-1 и ЕРО, определяют активность клеток иммунной, гемопоэтической и нервной тканей, в связи с чем изучали функциональные параметры перечислен-

ных тканей после введения ЕРО. В данной работе исследовали, как изменяются эффекторские функции указанных органов в ответ на введение ЕРО в сопоставлении с экспрессией названных генов. В селезенке мышей на фоне усиленной экспрессии всех изучаемых генов наблюдали стимуляцию гуморального иммунного ответа, который тестировали с помощью подсчета АОК. В костном мозге введение ЕРО привело к увеличению количества КОЕс-8, причем мы предполагаем, что это увеличение связано с повышением доли эритроидных предшественников, на которые и оказывает влияние ЕРО. Влияние ЕРО на поведение животных мы исследовали в тесте «открытое поле». Исследовательская активность мышей в этом тесте была значительно повышена по сравнению с соответствующими показателями в контрольной группе, что свидетельствует о стимулирующем влиянии ЕРО на эффекторские функции нервной системы, причем происходит это на фоне повышенного уровня экспрессии гена рецептора ЕРО и сниженного уровня экспрессии гена провоспалительного цитокина IL-1 β и его рецептора в клетках головного мозга животных. Эти данные свидетельствуют о том, что ЕРО влияет на функции органов лимфоидной, гемопоэтической и нервной тканей и свой эффект он может опосредовать через изменение уровня экспрессии генов IL-1 β , IL-1R, EPO-R.

ООО «ЦИТОКИН»

**разрабатывает и производит
иммуноферментные тест-системы
для количественного определения
цитокинов и компонентов комплемента человека**

*Цитокины: IL-1, рецепторный антагонист IL-1 (IL-1Ra),
IL-4, IL-8, TNF α , G-CSF, IFN α , IFN γ*

Компоненты комплемента: C3, C4, C5, C3a, C5a, C1-ингибитор, фактор H

*Полная комплектация, включая 96-луночные планшеты,
стандартные образцы, буферные растворы,
окрашивающие реагенты, подробные инструкции.*

*Высокая чувствительность, низкие цены,
доставка по России курьерской почтой.*

197110, Россия, Санкт-Петербург, Пудожская ул., д.7

**Тел. (812)230-48-88, тел./факс (812)230-49-46,
E-mail: emitrofanov@hotmail.com**