

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

ГРИБЫ РОДА *CANDIDA* СТИМУЛИРУЮТ ОБРАЗОВАНИЕ НЕЙТРОФИЛЬНЫХ ВНЕКЛЕТОЧНЫХ ЛОВУШЕК

Андреева Ю.С., Долгушин И.И., Савочкина А.Ю.,
Рыжкова А.И.

НИИ иммунологии ГОУ ВПО «Челябинская
государственная медицинская академия», г. Челябинск,
Россия

По данным ВОЗ, пятая часть населения Земли страдает различными грибковыми заболеваниями. Кандидоз — самый распространенный из системных микозов человека и заболеваний, связанных с кандидозным поражением слизистых оболочек, так как свыше 40% взрослых людей являются носителями *Candida albicans* (*C. albicans*), и любое серьезное нарушение местного или общего иммунитета может спровоцировать их активацию.

Слизистая влагалища является экологической нишей, в которой постоянно вегетирует большое количество различных видов бактерий, вирусов, грибов как у практически здоровых женщин, так и у больных. В структуре инфекционной патологии нижнего отдела гениталий кандиды составляют 40-50%. *C. albicans* считается основным возбудителем урогенитального кандидоза. На ее долю, по разным данным, приходится от 60 до 90% поражений.

В последние годы большой интерес исследователей вызывает изучение взаимоотношений между кандидами и факторами неспецифической защиты слизистых оболочек.

Несмотря на многочисленные исследования роли местного иммунитета в антикандидозной защите, недостаточно изучены механизмы взаимодействия кандид и нейтрофильных гранулоцитов, являющихся основными клетками секретов слизистых оболочек. В последние годы показано, что при действии бактерий нейтрофилы секретируют в окружающую среду свою ДНК, формируя нейтрофильные внеклеточные ловушки, которые участвуют в противоинфекционной защите слизистых оболочек.

Цель и задачи: определить влияние грибов рода *Candida* на формирование нейтрофильных внеклеточных ловушек.

Материалы и методы. Изучили влияние грибов рода *Candida* штамм 601 на образование внеклеточных ловушек нейтрофилами периферической крови женщин репродуктивного возраста и оценили эффективность улавливания дрожжеподобных грибов внеклеточными нейтрофильными сетями.

Основные результаты. В процессе активации *in vitro* грибами рода *Candida* нейтрофилы формируют внеклеточные нейтрофильные ловушки, при этом эффектив-

ность нейтрофильных внеклеточных сетей составляет 61,5%, а индекс ловушки — 5,11 микробных клеток, что значительно превышает показатели фагоцитоза.

Заключение. Грибы рода *Candida* стимулируют формирование нейтрофильных ловушек, при этом антимикробная эффективность нейтрофильных внеклеточных сетей значительно превосходит фагоцитарную активность гранулоцитов по отношению к дрожжеподобным грибам.

ИЗМЕНЕНИЕ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ ЦИТОКИНОВ В ОРГАНИЗМЕ ЖИВОТНЫХ ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ИНФЕКЦИИ, ВЫЗВАННОЙ *LISTERIA MONOCYTOGENES*

Антошина И.Ф., Шаповал И.М., Юров Д.С.,
Варфоломеев А.Ф., Ермолаева С.А., Мезенцева М.В.

ГУ НИИЭМ им. Н.Ф. Гамалеи РАМН, Москва, Россия

Патогенная бактерия *Listeria monocytogenes* размножается внутри цитоплазмы эукариотических клеток разных типов, включая гепатоциты, спленоциты, макрофаги и эпителиальные клетки. В ходе инфекции *L. monocytogenes* способна перемещаться из клетки в клетку, не покидая внутриклеточное пространство, что делает ее малодоступной для гуморальных факторов иммунной защиты. Считается, что протективный эффект при листериозной инфекции опосредуется цитолитическими Т-клеткам. Для понимания механизмов изменений в иммунной системе при листериозе в данной работе проведены эксперименты *in vivo* по исследованию изменений транскрипции генов регуляторных цитокинов в организме мышей Balb/c при экспериментальной инфекции, вызванной *L. monocytogenes*. Использовали штамм *L. monocytogenes* дикого типа EGDe. В эксперименте № 1 мышам внутривенно вводили суспензию бактерий, содержащую 103 КОЕ/мышь, что составляет 1/20 от LD50. В эксперименте № 2 доза заражения составляла 10⁴ КОЕ/мышь, т.е. около 1/2 LD50. Экспрессия генов 11 цитокинов (IFN α , IFN γ , IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12, IL-18, TNF α) оценивалась в спленоцитах, выделенных из селезенки мышей, по активности их мРНК, определяемой методами обратной транскрипции и полимеразной цепной реакции (ОТ-ПЦР). Спленоциты выделяли через 6 часов, 24 часа, 48 часов и 72 часа (эксперимент №1), а также через 6 часов, 3 суток и 7 суток после заражения животных *L. monocytogenes* (эксперимент № 2). В те же сроки производили высевы на чашки Петри для подсчета накопления бактерий в печени мышей.

В эксперименте № 1 было отмечено подавление экспрессии генов цитокинов, участвующих в синтезе IFN γ ; IFN α , IL-12 и IL-18. На протяжении 3 суток наблюдения было выявлено подавление экспрессии гена

только одного противовоспалительного цитокина — IL-4, но не IL-10. В течение всех 3 дней у животных, зараженных *L. monocytogenes*, была отмечена активация синтеза мРНК IL-6.

В эксперименте № 2 нами были обнаружены определенные закономерности изменения экспрессии генов цитокинов. В первые 6 часов и на протяжении всего срока наблюдения после заражения у мышей обнаруживалось подавление экспрессии генов цитокинов, вырабатываемых Th-1, IFN γ и IL-2, а также — IL-12. Так же было выявлено снижение продукции мРНК IL-10, вырабатываемого Th-2. В разные сроки в течение всего исследования (7 дней) у животных было отмечено подавление экспрессии генов цитокинов, вырабатываемых В-лимфоцитами и моноцитами/макрофагами: IL-1 β , IL-12 и TNF α — уже через 6 часов развития инфекции, IL-18 — начиная с 1 суток, IFN α — начиная с 2-3 дня после заражения. На протяжении всего срока наблюдения в некоторых случаях у мышей был обнаружен активный синтез мРНК IL-4 (противовоспалительный цитокин) и IL-6 (провоспалительный цитокин), вырабатываемых Th-2.

Таким образом, у мышей, зараженных *L. monocytogenes*, нами было обнаружено снижение экспрессии генов цитокинов, вырабатываемых Th-1, В-лимфоцитами и моноцитами / макрофагами, а также дисбаланс в синтезе цитокинов, продуцируемых Th-2. Изменения в экспрессии генов цитокинов имели более выраженный характер при более высокой дозе заражения. На основании полученных данных можно предположить, что при листериозе происходит нарушение функций практически всех иммунокомпетентных клеток организма. Исследования продолжаются.

РАЗЛИЧИЯ В ТЕЧЕНИИ СПЕЦИФИЧЕСКОГО ВОСПАЛЕНИЯ ЛЕГОЧНОЙ ТКАНИ, ВЫЗВАННОГО *M. AVIUM*, У МЫШЕЙ ОППОЗИТНЫХ ЛИНИЙ I/ST И C57BL/6

Авербах М.М., Кондратьева Е.В.

ГУ Центральный НИИ туберкулеза РАМН, Москва, Россия

В проведенных ранее исследованиях было показано, что мыши I/St чрезвычайно чувствительны к таким внутриклеточным инфекциям, как *M. tuberculosis* и таксономически неродственным — *Chlamydia pneumoniae* и *Salmonella enterica*.

M. Avium — наиболее распространенный вид нетуберкулезных микобактерий, также может обуславливать легочную патологию, особенно в ассоциации с ВИЧ-и СПИД-инфекцией. В связи с этим мы изучали характер инфекционного процесса, вызванного вирулентным штаммом *M. Avium* 724R у инбредных линий мышей I/St и B6, чувствительных и резистентных к *M. tuberculosis*. В результате исследования выявлены оппозитные по чувствительности к заражению *M. Avium* линии инбредных мышей I/St (резистентная) и B6 (чувствительная). Аэрогенное заражение мышей дозой 2×10^3 КОЕ привело к гибели чувствительной линии B6 на 5-6-й месяц после заражения. Всевесомость *M. Avium* из ткани легких мышей B6, начиная с 8 недели после заражения, была достоверно по сравнению с мышами I/St. Морфологически значимые различия в характере течения специфического воспаления выявляются начиная с 8-й недели после заражения и на 16-ю неделю у мышей линии B6

выявлены очаги распада легочной ткани. Аналогичные межлинейные различия отмечены между линиями мышей при изучении количества и фенотипа клеток, инфильтрирующих ткань легкого. Уровень клеток в легком, лимфоцитов, CD4, CD8, CD19, Mac3 и Lyb6G положительных клеток у мышей B6 был значительно выше, чем у мышей I/St. На 16-й неделе количество лимфоцитов, CD4, CD8, CD19 положительных клеток у мышей B6 снижалось и практически не отличалось от уровня мышей I/St. У последней линии отмечена тенденция к постепенному увеличению в легком количества CD4, CD8, CD19 и Mac3 положительных клеток к 16-й неделе после заражения. У мышей чувствительной линии B6 выявлено значительное превышение уровня интерлейкинов: IFN γ , TNF α и IL-12 на 8-ю и 16-ю недели после заражения по сравнению с резистентной линией I/St. Изучение уровня экспрессии генов некоторых хемокинов показало, что у зараженных мышей чувствительной линии B6 по сравнению с незараженным контролем выявлено увеличение экспрессии гена Csf3 (синтез G-CSF) в 10,6 раза на 8-й неделе и в 4 раза на 13-й и 16-й неделях после заражения. Выявлено увеличение экспрессии генов, ответственных за синтез факторов привлечения нейтрофилов: Xcr1 в 5,6 раза на 3-й неделе, в 10,5 раза на 8-й неделе, в 8 раз на 13-й неделе и в 2,6 раза на 16-й неделе после заражения; MIP-2 в 2,8 раза на 13-й неделе, а на 16-й неделе в 14 раз и KC лишь на 16-й неделе после заражения в 7,5 раза. У резистентной линии мышей I/St выявлены значительные отличия. Уровень экспрессии указанных выше генов в основном не отличался от незараженного контроля. Исключение составил ген Csf3, активность которого была выше в 3,3 раза на 3-й неделе после заражения. Уровень экспрессии гена MIP-2 был снижен в 3 раза на 8-й неделе.

ВЛИЯНИЕ ФАКТОРОВ ФИЗИЧЕСКОЙ ТЕРАПИИ НА СОСТОЯНИЕ ИММУННОЙ СИСТЕМЫ

Базарный В.В.

Уральская государственная медицинская академия, г. Екатеринбург, Россия

Иммунореабилитация является полноправной составной частью восстановительной медицины. В связи с этим сохраняется актуальность поиска новых иммуоориентированных технологий восстановительного лечения, что определило цель работы — проанализировать влияние ультразвука (УЗ), магнитолазерной терапии (МЛТ) и динамической электронейростимуляции (ДЭНС) на некоторые показатели морфофункционального состояния иммунной системы.

В экспериментальном исследовании на крысах указанные физические факторы использовали на различных экспериментальных моделях (стресс, перелом трубчатых костей, кожная рана). Для оценки состояния иммунной системы использовали комплекс тестов, включающий подсчет количества иммунокомпетентных клеток в костном мозге и крови, соотношение Т- и В-зависимых зон в селезенке и лимфатических узлах, определение функционально-метаболической активности нейтрофилов и концентрации некоторых острофазовых белков (СРБ, церулоплазмин, альбумин).

Воздействие физических факторов приводило к стимуляции Т-клеточного звена иммунитета, а МЛТ вызывала также и активацию фагоцитов. УЗ и МЛТ оказали

заметное противовоспалительное действие, у ДЭНС этот эффект был заметно менее выражен.

При воздействии всех физических факторов на область поврежденной ткани было отмечено увеличение доли лимфоцитов в зоне повреждения.

Таким образом, изученные физиотерапевтические воздействия (МЛТ, УЗ, ДЭНС) обладают схожими во многом иммуотропными эффектами, оказывают как системное, так и локальное иммуностимулирующее воздействие, степень которого может меняться в зависимости от особенностей физического фактора.

ВЛИЯНИЕ «ЦИТОФЛАВИНА» НА ФУНКЦИОНАЛЬНУЮ АКТИВНОСТЬ ИММУНОКОМПЕТЕНТНЫХ КЛЕТОК ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ ДИАБЕТЕ

Биличенко С.В., Саватеева-Любимова Т.Н., Саватеев А.В.

ФГУН «Институт токсикологии» ФМБА РФ, Санкт-Петербург, Россия

Введение. В настоящее время общепризнанна роль гипергликемии в развитии поздних диабетических осложнений. Однако наряду с этим ведущим фактором другими механизмами повреждающего действия являются накопление свободных радикалов, способных изменять структуру ДНК и вызывающих цитотоксическое действие, недостаточность антиоксидантной системы и активация аутоиммунного процесса.

Цель исследования: изучение эффективности нового отечественного препарата «Цитофлавин», обладающего антиоксидантными и антигипоксическими свойствами, в условиях экспериментального диабета. В задачи исследования входило изучение влияния «Цитофлавина» на гликемические показатели, липидный профиль (общий холестерин, триглицериды, ЛПОНП, ЛПВП), процессы ПОЛ, состояние антиоксидантной системы, функциональную активность спленоцитов в сравнении с α -липоевой кислотой.

Материалы и методы. Эксперименты выполнены на 80 белых крысах-самцах стандартной массой 180–200 г. Развитие диабета моделировали путем п/к введения аллоксангидрата («Хемапол», Чехия) в дозе 150 мг/кг голодавшим в течение суток крысам, затем в течение 5 дней в/ж вводили «Цитофлавин» и липоевую кислоту в дозах 100 и 20 мг/кг соответственно. В ходе эксперимента фиксировали уровни глюкозы, общих липидов, триглицеридов, липопротеидов и холестерина сыворотки крови, показатели процессов перекисного окисления липидов

(ПОЛ) и антиоксидантной защиты, уровень пролиферативной активности и апоптоза лимфоцитов селезенки. Биохимические показатели определяли общепринятыми методами. Функциональное состояние клеток и уровень апоптоза в культуре лимфоцитов, выделенных из селезенки экспериментальных животных, изучали методом МТТ-теста по индексу пролиферативной активности при добавлении лимфоцитарных митогенов и при окрашивании ДНК флюоресцирующим красителем Hoechst 33342. Методом флюоресцентной микроскопии оценивали соотношение клеток с нормально и апоптотически расположенной в ядре ДНК. Для позитивного контроля к культуре клеток добавляли смесь TNF α в концентрации 500 Ед/мл и актиномицина Д в концентрации 1 мг/мл. Спленоциты получали путем гомогенизации и фильтрации селезенки.

Результаты. Установлено, что «Цитофлавин», незначительно влияя на показатели углеводного обмена, практически полностью нормализовал состояние липидного обмена, системы ПОЛ и антиоксидантной защиты, нарушенные вследствие воздействия диabetогена — аллоксана. Как следует из данных, представленных в таблице, «Цитофлавин» оказал выраженное позитивное действие в отношении повышенного уровня функциональной активности спленоцитов.

Заключение. Новый отечественный препарат «Цитофлавин» может быть включен в комплексную терапию сахарного диабета с целью профилактики развития поздних диабетических осложнений. В основе его позитивного действия лежит нормализующее влияние на процессы липидного обмена, окислительно-восстановительные реакции и функциональную активность иммунокомпетентных клеток.

МАКРОФАГИ КАК ВОЗМОЖНЫЕ РЕГУЛЯТОРЫ ДЕДИФФЕРЕНЦИРОВКИ КЛЕТОК ПЕЧЕНИ И ПОЧЕК ПРИ ПОВРЕЖДЕНИИ ОРГАНОВ

Юшков Б.Г., Брыкина И.А., Крохина Н.Б.

Институт иммунологии и физиологии УрО РАН, г. Екатеринбург, Россия

Одним из вероятных механизмов, обеспечивающих репаративную регенерацию тканей, является дедифференцировка и пролиферация оставшихся неповрежденными клеток. В настоящее время признано, что макрофаги способны регулировать неиммунологические реакции организма и, в частности, регенераторные процессы.

ТАБЛИЦА. ВЛИЯНИЕ «ЦИТОФЛАВИНА» И α -ЛИПОВОЙ КИСЛОТЫ НА УРОВЕНЬ ПРОЛИФЕРАТИВНОЙ АКТИВНОСТИ СПЛЕНОЦИТОВ И УРОВЕНЬ АПОПТОЗА В НИХ (К ТЕЗИСАМ БИЛИЧЕНКО С.В. И ДР.)

Экспериментальные группы	Уровень пролиферативной активности		Уровень апоптоза
	Индекс реакции, $M \pm m$	% по отношению к интактным животным	% соотношения клеток
Интактные	1,25 \pm 0,03	100	2,00 \pm 1,23
Аллоксан (А)	1,45 \pm 0,03*	116	31,00 \pm 6,40*
А + «Цитофлавин»	1,22 \pm 0,06^	98	6,20 \pm 0,58^
А + α -липоевая к-та	1,36 \pm 0,06	109	14,75 \pm 3,43*^

Примечание. * – $p \leq 0,05$ по отношению к интактным животным; ^ – $p \leq 0,05$ по отношению к нелеченым животным.