

Фундаментальные исследования в биологии и медицине

**ВЛИЯНИЕ БАКТЕРИАЛЬНОГО
ИММУНОМОДУЛЯТОРА НА
ФУНКЦИОНАЛЬНУЮ АКТИВНОСТЬ
МОНОНУКЛЕАРНЫХ ЛЕЙКОЦИТОВ
ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА**

Ахматова¹ Н.К., Лебединская² Е.А.,
Мелехин² С.В., Лебединская² О.В., Доненко¹ Ф.В.,
Шехмамиев² Р.М., Киселевский¹ М.В.
¹ГУ РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН, Москва,
²ГОУ ВПО ПГМА им.ак. Е.А. Вагнера Росздрава,
Пермь

В настоящее время для терапии онкологических и инфекционных заболеваний создаются бактериальные иммуномодулирующие препараты, активирующие макрофаги, лимфоциты, натуральные киллеры (НК-клетки), супрессированные опухолевым процессом.

Цель работы — исследование влияния бактериальной вакцины на цитотоксическую активность (ЦА) мононуклеарных лейкоцитов (МЛ) периферической крови человека в культурах.

МЛ выделяли из стабилизированной гепарином периферической крови 15 здоровых доноров. Кровь, разведённую в 2 раза средой 199, центрифугировали в градиенте плотности фиколл-урографина. МЛ, образовавшие интерфазное кольцо, собирали, отмывали в среде 199 и осаждали центрифугированием. Для дальнейшего использования в эксперименте культивировали клетки-мишени эритробластного лейкоза К-562 и колоректального рака Colo в среде RPMI-1640. Использовали поликомпонентную вакцину «Иммуновак-ВП-4» из антигенов условно-патогенных микроорганизмов (ГУ НИИВС им. И.И. Мечникова РАМН), содержащую липополисахаридный комплекс (ЛПС), ассоциированный с белком наружной мембраны грамотрицательных микроорганизмов, пептидогликан, теиховые кислоты и лабильные белковые компоненты стафилококка. Предварительно определяли прямое цитотоксическое действие вакцины на клетки линии К-562 и Colo в концентрациях от 0,1 до 10,0 мкг/мл и установили отсутствие эффекта. В дальнейшем к МЛ добавляли вакцину в дозах от 0,01 до 10 мкг/мл и инкубировали в течение 72 часов. Для выявления ЦА клеток использовали тест восстановления 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолия бромид (МТТ-тест). Цитотоксическую активность МЛ определяли на линии К-562 и Colo. Опухолевые клетки (3×10⁴ в 1 мл) инкубировали в культуральной среде с обработанными вакциной МЛ в соотношениях 1:5; 1:2,5; 1:1 в микропланшетах. Затем в лунки добавляли витальный краситель МТТ и по оптической плотности, измеряемой на мультискане, рассчитывали процент лизиса опухолевых клеток. Максимальная спонтанная киллерная активность МЛ отмечалась при соотношении 1:5. При данном соотношении клеток-мишеней и клеток-эффекторов вакцина во всех дозах оказывала наибольший стимулирующий эффект на ЦА мононуклеаров по отношению к клеткам линии Colo. Далее была изучена способность вакцины ВП-4 индуцировать НК-активность МЛ по отношению к

клеткам линии К-562 с выбранным наиболее оптимальным соотношением клеток-мишеней и клеток-эффекторов — 1:5. Внесение в среду культивирования вакцины в концентрациях 1,0 и 10,0 мкг/мл достоверно повышало уровень цитотоксичности МЛ по отношению к клеткам линии К-562. В эксперименте наблюдался дозозависимый эффект влияния вакцины ВП-4 на цитотоксичность мононуклеарных лейкоцитов.

Можно предположить, что при использовании вакцины «Иммуновак-ВП-4» происходит: во-первых, взаимодействие антигенов препарата с ЛПС-рецепторами моноцитов/макрофагов, содержащихся в популяции МЛ с последующей инициацией секреции регуляторных цитокинов (IL-12, TNF и др.), а во-вторых, активация Т-лимфоцитов и НК-клеток (основных эффекторов противоопухолевого иммунитета) под действием белковых компонентов вакцины.

Сложные механизмы влияния подобных вакцин пока изучены недостаточно, что требует продолжения исследований для обоснования применения их в практике клинической онкологии в качестве иммуномодулирующих препаратов.

**ДИНАМИКА ФАГОЦИТАРНОЙ АКТИВНОСТИ
ДЕНДРИТНЫХ КЛЕТОК, ГЕНЕРИРОВАННЫХ
ИЗ КЛЕТОК-ПРЕДШЕСТВЕННИКОВ
КОСТНОГО МОЗГА МЫШЕЙ**

Ахматова¹ Н.К., Лебединская² О.В.,
Киселевский¹ М.В., Гармашова² Е.А.,
Шехмамиев² Р.М., Болотова² Е.И.,
Гусманова² П.С., Пепеляева² Е.А., Мелехин² С.В.
¹ГУ РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН, Москва,
²ГОУ ВПО ПГМА им. ак. Е.А. Вагнера Росздрава,
Пермь

Дендритные клетки (ДК) являются гетерогенными антиген-презентирующими клетками костномозгового происхождения, способными инициировать и регулировать как первичный, так и вторичный Т и В-клеточный иммунитет. На поверхности ДК имеются специфические рецепторы врожденного иммунитета, которые распознают патоген-ассоциированные молекулярные структуры (ПАМС) микроорганизмов.

Цель работы — сравнительное изучение динамики фагоцитарной активности незрелых дендритных клеток и ДК, активированных фактором некроза опухоли (ФНО-α) и вакциной Иммуновак-ВП-4, содержащей антигены условно-патогенных микроорганизмов.

Для получения дендритных клеток использованы клетки костного мозга 20 мышей линии СВА. Костный мозг переводили в полную культуральную среду, содержащую гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор и интерлейкин-4 — для генерации ДК. Затем заменяли среду с добавлением в неё вакцину Иммуновак-ВП-4 (25 мкг/мл) или ФНО-α (20 нг/мл), способствующих образованию зрелых дендритных клеток.

Фагоцитарную активность ДК оценивали по поглотительной способности в отношении штаммов *St. aureus*: 0,4 мл взвеси культуры ДК (10×10^6 кл/мл) смешивали с 0,6 мл взвеси микробных клеток (1×10^9 кл/мл) и инкубировали в течение 5, 30 минут, 1,5 и 3-х часов. Далее клетки отмывали средой 199, готовили мазки из клеточной взвеси. Остатки помещали в термостат, готовили мазки повторно через указанные интервалы времени и окрашивали азур II – эозином.

Определяли фагоцитарный индекс (ФИ) — процент клеток, вступивших в фагоцитоз и фагоцитарное число — среднее число бактерий, находящихся внутриклеточно (частное от деления общего числа поглощённых бактерий на число клеток, вступивших в фагоцитоз). Оба показателя рассчитывали в мазках, сделанных после 30-минутной и 1,5–3 часовой инкубации. Незрелые ДК активно фагоцитировали бактерии по сравнению с ДК, активированными вакциной Иммуновак-ВП-4 и ФНО- α . Уже через 5 мин. после введения культуры *S. aureus* в среду с незрелыми дендритными клетками ФИ составил 23,1%. В последующие сроки наблюдения фагоцитарный индекс повышался до 55,1–57,2%. При добавлении в среду культивирования ФНО- α фагоцитарная активность ДК была существенно ниже (через 5 мин. ФИ равнялся 5,1%, а в дальнейшем увеличивался только до 11,7–12,4%). По сравнению с ФНО- α , фагоцитарный индекс при использовании вакцины ВП-4 повышался (через 5 мин. — 12,6%, а после 3-х часов инкубации составлял 18,3%). Уменьшение фагоцитарной активности зрелых ДК является, вероятно, результатом фенотипических изменений, происходящих с ними (в частности изменением уровня экспрессии рецепторов, опосредующих взаимодействие с бактериальными компонентами).

Таким образом, из исследуемых иммуномодуляторов (ФНО- α и вакцина ВП-4) наилучшим индуктором созревания дендритных клеток, обладающих более высокой фагоцитарной активностью, явилась поликомпонентная вакцина Иммуновак-ВП-4.

МОРФОГЕНЕЗ ДВИГАТЕЛЬНЫХ НЕРВНЫХ ОКОНЧАНИЙ МЫШЦ ЧЕЛЮСТНОГО АППАРАТА БЕЛЫХ КРЫС

Беззубенкова О.Е.

Ульяновский государственный
педагогический университет,
Ульяновск

С целью изучения особенностей морфогенеза двигательных нервных окончаний мышц челюстного аппарата исследованы 110 самцов беспородных белых крыс в период с 3-го по 180-й день постнатального онтогенеза. Ферментоактивные зоны (ФАЗ) в области нейромышечного синапса изучали гистохимической методикой с применением тиоуксусной кислоты в модификации Николаева Г.М. и Шилкина В.В.. Для выявления структурных элементов двигательных нервных окончаний срезы мышц импрегнировали азотнокислым серебром по методике Бильшовского-Грос. Морфогенез интраорганного двигательного ин-

нервационного аппарата поверхностной жевательной, двубрюшной и подбородочно-подъязычной мышц сопровождается возрастанием удельного содержания сложных ФАЗ и усложнением их трабекулярной структуры, преобразованием овоидной формы нейромышечных синапсов в веретеновидную, увеличением значений основных морфометрических показателей (площадь, периметр диаметр) ФАЗ, повышением уровня иннервированности мышц. При этом перестройка АХЭ-позитивных зон тесно взаимосвязана с изменениями морфологии двигательных нервных окончаний, проявившимися в увеличении относительного количества нервных окончаний с магистральным типом ветвления аксона, возрастании площади моторных бляшек, количества их терминалей и нейроглиальных ядер, а также в утолщении претерминального нервного волокна.

В развитии двигательных окончаний мышц челюстного аппарата можно выделить два этапа: этап интенсивного роста и дифференцировки (3–120 дни), отличающийся существенным увеличением значений морфометрических показателей системы «нервное окончание – мышечное волокно» и быстрой дифференцировкой нейромышечных синапсов; этап относительной стабилизации (120–180 дни), характеризующийся незначительными морфологическими преобразованиями мышечных волокон и их интраорганного двигательного иннервационного аппарата.

СТРУКТУРА ПЕЧЕНИ И СЕЛЕЗЁНКИ КРЫС В ПЕРИНАТАЛЬНОМ ПЕРИОДЕ ПРИ СТАФИЛОКОККОВОЙ ИНТОКСИКАЦИИ

Гуляева Н.И., Мелехин С.В., Кондрацкая Е.Л.,
Валиулина Г.Т., Мухамедзянова М.Р.

ГОУ ВПО ПГМА им. ак. Е.А.Вагнера Росздрава,
Пермь

В настоящее время доказано, что инфицирование плаценты, приводящее к ее недостаточности, вызывает различную патологию у потомства.

Целью работы являлось изучение морфологии печени и селезёнки плодов и рождённых крысят после внутривенного введения в материнскую кровь токсина стафилококка.

Экспериментальная группа включала 20 беспородных белых крыс весом 150–200г, которым на 2-й день беременности внутривенно вводили токсин стафилококка. У половины животных на 21-й день беременность прерывали для исследования органов плодов и наблюдали гибель части потомства. Контрольную группу составили здоровые беременные крысы (6 животных). Сохранившихся плодов и родившихся крысят поделили на 4 группы: 1-я – плоды на 21-й день эмбриогенеза (контроль–5 животных); 2-я – крысята на 7-й день после рождения (контроль–5 животных); 3-я – плоды на 21-й день эмбриогенеза, забранные у крыс экспериментальной группы (5 животных); 4-я – крысята на 7-й день после рождения от матерей экспериментальной группы (5 животных). У плодов и крысят всех 4-х групп забирали печень и селезёнку. Органы фиксировали в формалине, парафиновые сре-