

## ИЗУЧЕНИЕ МЕХАНИЗМОВ ДЕЙСТВИЯ ОБРАБОТАННЫХ РАЗЛИЧНЫМИ ИММУНОМОДУЛЯТОРАМИ АУТОЛОГИЧНЫХ ЛЕЙКОЦИТОВ IN VITRO.

Изучены механизмы иммуномодулирующего действия аутологичных лейкоцитов, обработанных *in vitro* различными иммуномодуляторами, по сравнению с прямым действием этих иммуномодуляторов на культуру клеток. В качестве иммуномодуляторов использовали стафилококковый анатоксин ( $10^{-4}$ ), He-Ne лазерное излучение (мощность излучения 2,6 мВт/см<sup>2</sup>), тималин (100 мкг/мл), эуфиллин ( $10^{-4}$ М). Обработанные клетки в условиях совместного культивирования с аутологичными интактными лейкоцитами изменяли экспрессию E-рецепторов, HLA-DR антигена на лимфоцитах, метаболическую активность нейтрофилов, спонтанную и ЛПС-стимулированную продукцию ФНО $\alpha$ . Иммуномодулирующий эффект в смешанной культуре значительно превосходил по выраженности и не соответствовал по направлению прямому эффекту иммуномодуляторов на клетки и был обусловлен непосредственным взаимодействием клеток. В супернатантах смешанных культур, содержащих обработанные и интактные клетки, (но не монокультур) выявлены регулирующие факторы, изменяющие способность аутологичных нейтрофилов к спонтанной миграции, усиливающие лимфокин-продуцирующую активность лимфоцитов и повышающие чувствительность нейтрофилов к иммуномодуляторам.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА:** *иммуномодуляция, лейкоциты, in vitro.*

### THE MECHANISMS OF INFLUENCE OF TREATED BY IMMUNOMODULATORS OF AUTOLOGIC LEUCOCYTES IN VITRO.

*I.A.NOVICOVA*

*Medical University, Vitebsk, Belarus.*

The mechanisms of immunomodulation influence of autologic treated by various immunomodulators of leucocytes on the cells of immune system in comparison with the direct action of these immunomodulators on the cell culture. For mononuclear modification the staphylococcus anatoxin ( $10^{-4}$ ), He-Ne laser irradiation (2,6 mVt/cmI), thymalin (100 mkg/ml), eufillin ( $10^{-4}$ M) have been used. Treated cells in conditions of mixed culturing with the autological intact leucocytes have changed the expression of E-receptors, HLA-DR antigen in lymphocytes, metabolic activity of neutrophiles, spontaneous and LPS-stimulated production of FNO $\alpha$ . Immunomodulation effect in this mixed culture significantly prevailed in expression and not correlated in the directions of the direct effect of immunomodulators on the cells and it was not caused immediate interaction of cells. In supernatants of mixed treated cultures (but not monocultures) the regulated factors changing the ability of autological neutrophiles to spontaneous migration intensifying the lymphokin-produced activity of lymphocytes and increasing the sensitivity of neutrophiles to immunomodulators have been detected.

**KEY WORDS:** *immunomodulation, leucocytes, in vitro.*

Одним из направлений развития современной иммунофармакологии является оптимизация методов применения иммуномодуляторов (ИМ), в частности, путей их введения в организм, обеспечивающих максимальную биодоступность препаратов для клеток-мишеней и повышающих эффективность терапии при минимуме побочных реакций. В связи с этим все более широкое распространение получают методы иммунокоррекции, основанные на введении в организм аутологичных лейкоцитов, активированных в условиях *in vitro* различными иммуномодуляторами, - так называемая “адоптивная” или экстракорпоральная терапия [2,11,13,14,17]. Рядом авторов показана высокая эффективность экстракорпорального использования фармакотерапевтических средств (диуцифон, лейкинферон, дексаметазон), физических факторов, интерлейкинов у больных онкологическими и воспалительными заболеваниями различного генеза [8,10,15,16]. Однако при этом многие стороны механизмов, посредством которых реализуется иммунокорректирующий эффект такого лечения, возможный вклад процессов межклеточного взаимодействия изучены недостаточно, что препятствует созданию научно-обоснованного подхода к назначению экстракорпоральной терапии.

**Цель настоящей работы:** изучить механизмы реализации иммуномодулирующего эффекта лейкоцитов, обработанных физическими и фармакотерапевтическими средствами, на клетки системы иммунитета и сравнить его с прямым действием этих иммуномодуляторов на культуру клеток.

**Материал и методы.** Исследования проведены на мононуклеарах крови 50 здоровых лиц и 45 больных гнойной хирургической инфекцией. Проведение исследований потребовало использования различных ИМ для анализа сопоставимости эффектов в зависимости от способов их применения и доказательства универсальности механизмов их действия через обработанные клетки.

В качестве иммуномодуляторов использовали тималин в конечной концентрации (100 мкг/мл), стафилококковый анатоксин ( $10^{-4}$ ), преднизолон (30мкг/мл), эуфиллин ( $10^{-4}$ М), He-Ne лазерное излучение (мощность излучения 2,6 мВт/см<sup>2</sup>). Длительность преобработки клеток иммуномодуляторами и их оптимальные концентрации подобраны нами в предварительных исследованиях [5].

В работе использовали как неразделенную

фракцию мононуклеаров (МНК) периферической крови, так и очищенную суспензию лимфоцитов после удаления адгезирующей фракции. МНК выделяли из крови путем центрифугирования на градиенте плотности фиколл-верографина[3]. Влияние иммуномодуляторов изучали в 2-х вариантах: 1) оценка непосредственного эффекта на суспензию МНК, 2) оценка эффекта модифицированных ИМ МНК на свежевыделенные аутологичные МНК. Для оценки непосредственного эффекта препаратов МНК в концентрации  $2-2,5 \times 10^6$  /мл инкубировали с одним из ИМ в течение 30 минут при 37°C (при использовании лазера - в течение 5 минут, с последующей инкубацией в среде 25 минут), отмывали средой RPMI 1640 и использовали в реакциях. Контролем служила инкубация клеток в среде без иммуномодулятора.

Оценка эффекта обработанных препаратами лимфоцитов осуществлялась в условиях их совместного культивирования с аутологичными свежевыделенными клетками. Для этого производили преобработку МНК иммуномодуляторами, как описано выше, а затем приготавливали смешанную культуру из 15% модифицированных и 85% аутологичных интактных МНК. Общая концентрация клеток в культуре  $2-2,5 \times 10^6$  /мл. Смешанную культуру инкубировали 0,5 часа при 37°C, а затем производили постановку реакций.

Изучен эффект иммуномодуляторов в различных модельных системах на розеткообразующую способность лимфоцитов [3], базальную и стимулированную *St. aureus* метаболическую активность нейтрофилов [12]. Влияние ИМ и модифицированных клеток на экспрессию антигенов HLA-DR на лимфоцитах оценивали при их культивировании 2,6,12 часов в полной культуральной среде, состоящей из RPMI -1640 с добавлением 5% сыворотки крови IV группы и 0,1 мг/мл гентамицина. HLA-DR антигены определяли с помощью моноклональных антител ИКО-1 в реакции непрямой иммунофлуоресценции.

Для оценки эффекта ИМ на продукцию ФНО $\alpha$  выделенные из крови МНК преинкубировали с ИМ или обработанными лимфоцитами в течение 0,5 часов при 37°C, после чего клетки отмывали, ресуспензировали в полной культуральной среде в концентрации  $2 \times 10^6$  /мл и инкубировали в течение 12 часов при 37°C в атмосфере с 5% CO<sub>2</sub>. Для оценки стимулированной продукции в ряд культур вносили ЛПС *E. coli* в конечной концентрации 10 мкг/мл.

Содержание ФНО $\alpha$  в супернатантах культур оценивали иммуноферментным методом с помощью тест-систем ООО "Цитокин" (г. Санкт-Петербург). Для оценки чувствительности МНК к ЛПС дополнительно рассчитывали индекс стимуляции как отношение величины стимулированной продукции ФНО $\alpha$  к спонтанной.

Для получения и тестирования супернатантов различных клеточных систем производилась импульсная обработка клеток стафилококковым анатоксином (30 минут при 37 $^{\circ}$ C) или лазером (2,6 мВт/см $^2$  в течение 5 минут), после чего МНК отмывали, ресуспендировали в полной питательной среде и инкубировали в монокультуре или в смешанной культуре с интактными аутологичными клетками различные промежутки времени (0,5 - 6 часов) в среде RPMI 1640 без добавления сыворотки при 37 $^{\circ}$ C в атмосфере 5% CO $_2$  при клеточной плотности 3-4x10 $^6$ кл/мл. Жизнеспособность клеток контролировали в тесте с трипановым синим. По окончании инкубации клетки удаляли центрифугированием, кондиционную среду собирали, добавляли 5% сыворотки крови IV группы, 0,1 мг/мл гентамицина и использовали как культуральную среду для свежих отмытых аутологичных мононуклеаров или полинуклеаров. В суспензии мононуклеаров через 12 часов инкубации с кондиционной средой при 37 $^{\circ}$ C в атмосфере с 5% CO $_2$  оценивали спонтанную продукцию ФНО $\alpha$  иммуноферментным методом. В суспензии полинуклеаров в разное время после инкубирования оценивали изменение спонтанной и ФГА-индуцированной миграции в капиллярном варианте реакции миграции лейкоцитов [3]. Степень изменения спонтанной миграции клеток под влиянием супернатантов выражали в индексах миграции, которые рассчитывали по формуле:  $ИМ = \frac{\text{количество мигрировавших клеток в среде с супернатантом}}{\text{количество мигрировавших клеток в среде без супернатанта}}$ .

В части исследований за 0,5 часа до внесения супернатантов или через такое же время после лейкоциты обрабатывали иммуномодуляторами в течение 0,5 часа при 37 $^{\circ}$ C и сравнивали величину индекса миграции нейтрофилов, не обработанных супернатантом, под влиянием иммуномодулятора и индекса миграции обработанных супернатантом нейтрофилов.

Реакцию торможения миграции лейкоцитов ставили в непрямом варианте. Выделенные МНК подвергали импульсной обработке ФГА (20 мкг/мл в течение 2 часов). В части экспериментов перед

добавлением ФГА производили инкубацию клеток с тестируемыми супернатантами. Продукцию фактора ингибции миграции оценивали через 18 часов по степени подавления миграции аутологичных нейтрофилов.

Статистическую обработку данных проводили с использованием пакета прикладных программ Statgrafics Plus (для Windows 3.1).

## Результаты и обсуждение

В целом эффект обработанных ИМ клеток на розеткообразование был достоверно выше, чем непосредственное внесение препарата в культуру лимфоцитов. Так, анатоксин усиливал розеткообразование в общем тесте на 17,2 $\pm$ 2,1 %, а обработанные им лимфоциты на 32,4 $\pm$ 3,2% (P<0,02). Средняя степень угнетения розеткообразования при непосредственном действии эуфиллина составила 21,4 $\pm$ 2,8%, а в культуре, содержащей модифицированные эуфиллином и свежeweделенные лимфоциты—33,6 $\pm$ 2,9% (P<0,05). При использовании обработанных ИМ клеток отмечалось также достоверно меньшее (P<0,05) количество наблюдений с отсутствием эффекта. Так, тималин при внесении в культуру клеток в 50% случаях не изменял розеткообразование, а обработанные им лимфоциты - только в 16% (P<0,02).

В ряде случаев иммуномодулятор и обработанные им клетки оказывали противоположный эффект. В экспериментах по влиянию на Т-активные лимфоциты оппозитные эффекты обнаружены при использовании анатоксина в 33% экспериментов, преднизолона - 11% (P<0,02).

Результаты, полученные при работе с общей фракцией МНК, достоверно не отличались от таковых при использовании очищенной суспензии лимфоцитов.

Эффект ИМ в различных клеточных системах на экспрессию HLA-DR антигена приведен в таблице 1. В контрольной смешанной культуре, содержащей инкубированные без иммуномодулятора и свежeweделенные МНК, как и в контрольной культуре клеток, инкубированных без иммуномодулятора, экспрессия HLA-DR антигенов в течение прослеженного инкубационного периода не изменялась. Не отмечено также статистически значимых изменений этого показателя при 2-12 часовой инкубации культур клеток, обработанных анатоксином, преднизолоном или He-Ne лазером. В то же время, в условиях совместного культивирования

Таблица 1

**Динамика экспрессии HLA-DR антигена на лимфоцитах под действием ИМ или обработанных ими МНК в различные периоды инкубации.**

Условия обработки	Время инкубации (час)		
	2	6	12
Контроль	22,4±1,9	20,3±0,6	22,6±2,4
Контроль-СКЛ	24,6±1,9	24,2±1,5	23,2±2,8
Анатоксин	23,2±2,3	21,4±1,4	21,2±1,8
Анатоксин-СКЛ	30,2±0,5*(**)	31,0±1,1*(**)	23,2±2,2
Преднизолон	22,6±2,2	21,2±1,1	23,6±1,8
Преднизолон-СКЛ	25,2±1,8	27,8±1,1*(**)	22,8±2,3
He-Ne лазер	23,8±1,1	24,4±1,7	26,0±1,7
Лазер-СКЛ	28,8±1,2*(**)	31,8±1,4*(**)	25,2±1,5

**Примечание:**

\* – отмечены достоверные различия ( $P < 0,05$ ) по сравнению с контролем.

\*\* – отмечены достоверные различия по сравнению с прямым эффектом соответствующего иммуномодулятора. Контроль - клетки, инкубированные в среде, контроль-СКЛ - в культуры интактных клеток внесены лимфоциты, инкубированные без иммуномодулятора, анатоксин (преднизолон, лазер) - прямой эффект иммуномодуляторов; анатоксин (преднизолон, лазер)-СКЛ - культуры клеток, состоящие из обработанных соответствующим иммуномодулятором и интактных лимфоцитов.

обработанных этими ИМ и интактных лимфоцитов наблюдалось достоверное увеличение ( $P < 0,02$ ,  $P < 0,001$ ) экспрессии HLA-DR через 2 и 6 часов инкубации. Через 12 часов достоверных различий по величине изученного показателя в сравниваемых культурах не отмечено.

Обращает на себя внимание, что необработанные иммуномодуляторами, преинкубированные 0,5 часа в среде лимфоциты (контроль-СКЛ), при добавлении к свежим аутологичным лимфо-

цитам заметно стимулировали экспрессию HLA-DR, однако этот эффект проявлялся лишь в виде тенденции.

Эффект ИМ на продукцию ФНО $\alpha$  также отличался от действия обработанных этими ИМ лимфоцитов (Таблица 2). Действие последних было значительно более выраженным. Так, облучение всей клеточной культуры He-Ne лазером не изменяло способности клеток к спонтанной и стимулированной продукции ФНО $\alpha$ , но внесение в культуры

Таблица 2

**Влияние иммуномодуляторов и обработанных ими лимфоцитов на продукцию ФНО $\alpha$  МНК доноров (n=6).**

Условия эксперимента	Уровень ФНО $\alpha$ (пг/мл)		
	спонтанный	Стимулированный ЛПС	Индекс стимуляции
Контроль-СКЛ	363,0±46,1	1215,6±87,7	3,6±0,5
Лазер	421,2±38,7	1208,4±75,0	2,9±0,4
Лазер-СКЛ	595,4±55,1*(**)	1586,1±124,2*(**)	2,7±0,1
Анатоксин	759,4±49,8*	1026,6±69,9	1,3±0,05*
Анатоксин-СКЛ	892,6±81,3*	1976,8±78,3*(**)	2,3±0,2*(**)
Супернатант монокультур (лазер)	398,7±44,3	-	-
Супернатант монокультур (анатоксин)	416,4±59,5	-	-

**Примечание:**

\* – отмечены достоверные различия ( $P < 0,05$ ) по сравнению с контролем.

\*\* – отмечены достоверные различия по сравнению с прямым эффектом соответствующего иммуномодулятора. Сокращения использованы как в таблице 1.

интактных клеток 15% облученных аутологичных лимфоцитов сопровождалось статистически значимым увеличением продукции ФНО $\alpha$  по сравнению с его продукцией в культурах облученных МНК и по сравнению с необлученными клетками ( $P < 0,02$ ). Стимулирующий эффект анатоксина на спонтанную продукцию ФНО $\alpha$  проявлялся как при непосредственном внесении анатоксина в культуру клеток, так и в модельной СКЛ. В то же время индуцированная ЛПС продукция ФНО $\alpha$  увеличивалась только под влиянием обработанных анатоксином клеток, но не при прямом воздействии этим препаратом. При этом достоверно увеличивался и индекс стимуляции, что может указывать на повышение чувствительности клеток к активирующим воздействиям.

Выявленные нами эффекты обработанных ИМ клеток могут быть опосредованы как прямым их взаимодействием с интактными лимфоцитами в культуре, так и индуцированным ИМ синтезом растворимых продуктов с иммунорегуляторной активностью. Для оценки возможного вклада растворимых продуктов, вырабатываемых клетками под влиянием ИМ, в развитие конечного эффекта, мы сопоставили действие обработанных ИМ лимфоцитов или их супернатантов на спонтанную продукцию ФНО $\alpha$  МНК. Результаты исследований показали, что супернатант монокультур обработанных лейкоцитов не обладал модифицирующим действи-

ем на спонтанную продукцию ФНО $\alpha$  (Таблица 2). Это подтверждает необходимость непосредственного контакта обработанных клеток с интактными для развития иммуномодулирующего эффекта.

На следующем этапе работы нами была поставлена задача исследовать, происходит ли передача иммуномодулирующей информации от обработанных МНК к нейтрофилам. Для этого мы исследовали прямой и опосредованный через модифицированные клетки эффект анатоксина на метаболическую активность нейтрофилов больных хроническим остеомиелитом. Полученные результаты (Таблица 3) показали, что прямое внесение анатоксина в культуру лейкоцитов приводило к увеличению спонтанного включения НСТ нейтрофилами, но не оказывало достоверного влияния на секрецию активных форм кислорода при фагоцитозе *St. aureus*. Обработанные анатоксином клетки, напротив, не влияли существенно на спонтанную продукцию супероксид-аниона, то есть на уровень базальной стимуляции нейтрофилов, но статистически достоверно ( $P < 0,02$ ) увеличивали функциональный резерв фагоцитирующих клеток (индуцированный *St. aureus* НСТ-тест). Лимфоциты, не обработанные анатоксином, добавленные к интактным лейкоцитам, не изменяли спонтанное и стимулированное включение НСТ фагоцитирующими клетками.

Проведенные исследования показали, что в смешанной культуре обработанных иммуномодулятора-

**Таблица 3**

**Изменение супероксид-анион продуцирующей способности нейтрофилов больных хроническим остеомиелитом под влиянием стафилококкового анатоксина и обработанных им лимфоцитов.**

Клеточная система	Метаболическая активность нейтрофилов	
	Спонтанная	Индукцированная <i>St. aureus</i>
Контроль	16,6 $\pm$ 1,1	37,1 $\pm$ 1,1
Анатоксин	23,9 $\pm$ 1,3*	37,6 $\pm$ 0,8
Анатоксин-СКЛ	20,6 $\pm$ 0,8	46,0 $\pm$ 1,1**(**)

**Примечание:**

\* – отмечены достоверные различия ( $P < 0,05$ ) по сравнению с контролем.

\*\* – отмечены достоверные различия по сравнению с прямым эффектом соответствующего иммуномодулятора. Сокращения использованы как в таблице 1.

ми и интактных лейкоцитов происходит взаимодействие между ними, результатом которого является изменение экспрессии поверхностных рецепторов взаимодействующих клеток и их функциональных свойств. Реально предположить, что в результате такого взаимодействия может происходить продук-

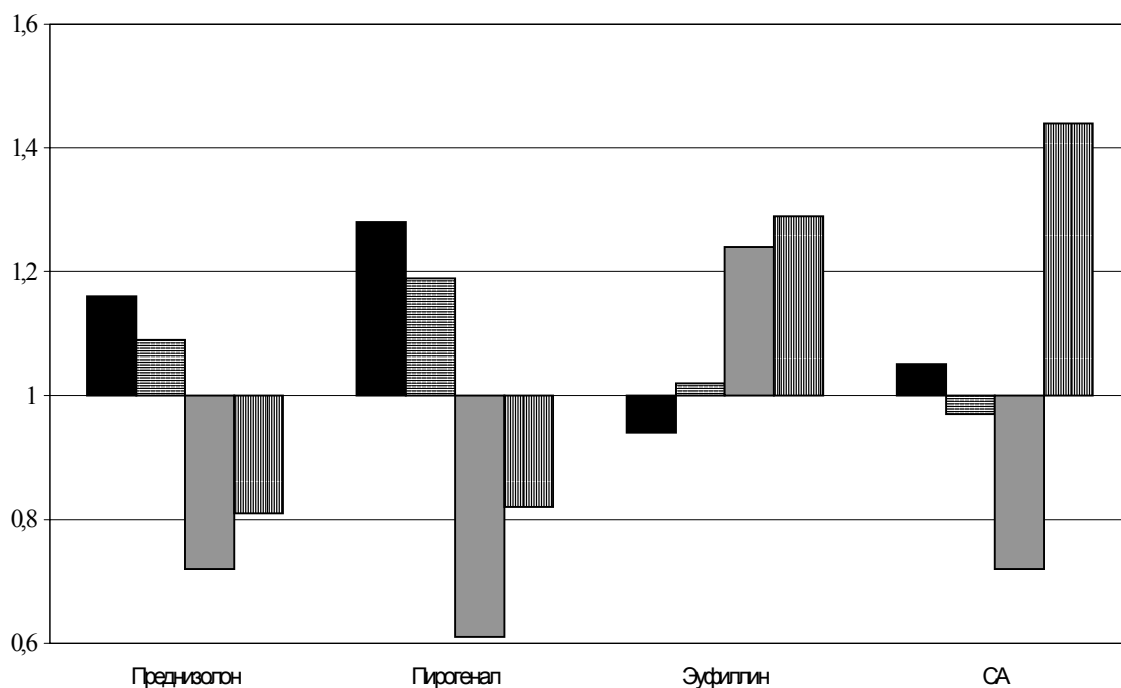
ция клетками эндогенных регулирующих факторов. Поэтому в дальнейшем мы изучили свойства кондиционной среды после различных сроков инкубации аутологичных смешанных двунаправленных культур интактных и обработанных иммуномодуляторами клеток.



индуцировала у них чувствительность к стафилококковому анатоксину, тогда как сам препарат без супернатанта достоверного влияния на спонтанную миграцию не оказывал. Преобработка супернатантами модифицированных СКЛ усиливала также модулирующий эффект на нейтрофилы преднизолон, пирогенала, эуфиллина. Причем, наблюдалось усиление как ингибирующего, так и стимулирующего эффектов иммуномодуляторов

(Рис. 1), что позволяет говорить о том, что факторы, содержащиеся в супернатантах, повышают общую чувствительность клеток к иммуномодуляторам. Следует подчеркнуть, что супернатант контрольных СКЛ, как и супернатант модифицированных СКЛ с исходной супрессорной активностью не обладали таким действием.

Добавление супернатантов к нейтрофилам после их обработки иммуномодуляторами в большинстве



**РИС. 1.** Влияние супернатантов на чувствительность нейтрофилов к иммуномодуляторам в тесте спонтанной миграции.

**Принятые сокращения:**

По оси абсцисс – индекс миграции.

- 1 - иммуномодулятор без супернатанта,
- 2 - супернатант к-СКЛ + иммуномодулятор,
- 3 - супернатант м-СКЛ лазерным излучением + иммуномодулятор,
- 4 - супернатант м-СКЛ стафилококковым анатоксином.

Нейтрофилы преинкубированы с 20% супернатантами 2-х часовых, модифицированных лазерным излучением или анатоксином и контрольных СКЛ. Представлены средние 20-ти экспериментов с клетками больных хроническим остеомиелитом.

\* - отмечены достоверные различия ( $P < 0,05$ ) по сравнению с миграцией без супернатанта.

случаев не изменяло миграционный ответ клеток. Тем не менее следует отметить способность гелий-неонового лазерного излучения повышать чувствительность тест-клеток к стимулирующему воздействию супернатантов. Однако эффект проявлялся

только при исходном наличии в супернатантах стимулирующей активности. В случае отсутствия исходного эффекта кондиционной среды СКЛ на миграцию нейтрофилов воздействие на клетки физических факторов не индуцировало ответа на супер-

натант de novo.

Влияние супернатантов модифицированных СКЛ на ФГА-индуцированное подавление миграции нейтрофилов также характеризовалось усилением эффекта. Индекс миграции под влиянием только ФГА составил при использовании в качестве тест-клеток лейкоцитов больных хроническим остеомиелитом  $0,18 \pm 0,04$ , а под влиянием ФГА и

супернатантов -  $0,36 \pm 0,06$  ( $P < 0,01$ ). Такой эффект супернатантов был отчасти связан с их способностью усиливать митоген-индуцированную продукцию фактора ингибиции миграции по сравнению с его продукцией в отсутствие супернатантов (Таблица 5).

Таким образом, представленные данные свидетельствуют о разностороннем иммуномодулирующем

**Таблица 5**

**Влияние преобработки МНК супернатантами на ФГА-индуцированную продукцию фактора ингибиции миграции.**

Условия индукции фактора ингибиции миграции	Индекс миграции
Супернатант СКЛ (лазер)	$0,91 \pm 0,12$
Супернатант СКЛ (анатоксин)	$0,98 \pm 0,09$
Супернатант контрольной СКЛ	$1,05 \pm 0,11$
ФГА	$0,77 \pm 0,08$
Супернатант СКЛ (лазер) + ФГА	$0,63 \pm 0,06^*$
Супернатант СКЛ (СА) + ФГА	$0,59 \pm 0,09^*$
Супернатант контрольной СКЛ + ФГА	$0,89 \pm 0,11$

**Примечание:** использованы 20% 4-х часовые супернатанты МНК больных хроническим остеомиелитом. Звездочкой отмечены достоверные различия ( $P < 0,05$ ) по сравнению с миграцией, индуцированной ФГА.

шем действии обработанных ИМ мононуклеаров. В то же время механизмы реализации их эффекта остаются неясными. Определенный вклад может вносить индуцированное иммуномодуляторами изменение экспрессии маркеров Т-лимфоцитов [4]. Согласно концепции, сформулированной основоположниками метода экстракорпоральной иммунофармакотерапии [2,9], обработанные ИМ клетки приобретают способность действовать как клетки-регуляторы и опосредовать эффект препаратов при межклеточных взаимодействиях. В экспериментальной системе с клетками селезенки мышей было показано соответствие эффекта клеток, обработанных Кон А или диуцифоном, и эффектов самих препаратов [9]. В то же время, некоторыми авторами продемонстрировано отсутствие полного совпадения эффектов препаратов и модифицированных ими клеток [1]. Результаты наших исследований на примере ИМ различных групп подтвердили, что действие обработанных лимфоцитов не соответствует прямому эффекту ИМ на культуру клеток, а иногда является противоположным. Модифицированные лимфоциты были способны оказывать эффект после кратковременной преинкубации с ИМ (0,5 час), скорее всего недостаточной для индукции клеток-регуляторов. Получен-

ные нами результаты указывают, что между обработанными ИМ и интактными лимфоцитами развивается взаимодействие по типу смешанной культуры, вследствие чего изменяется экспрессия рецепторов и функциональных свойств взаимодействующих клеток. Результаты взаимодействия определяются особенностями и состоянием участвующих клеток, поэтому значительно отличаются от прямого эффекта ИМ на культуру лимфоцитов. Несомненный интерес представляет, на наш взгляд, выявление в кондиционной среде смешанных, но не монокультур, растворимых факторов, регулирующих миграционную активность нейтрофилов и усиливающих чувствительность свежевыделенных клеток к иммуномодулирующим воздействиям. Существование таких факторов in vivo может обуславливать быстрое развитие эффекта при экстракорпоральной терапии за счет повышения чувствительности необработанных клеток к применяемому одновременно другим видам терапии и эндогенным регуляторным факторам. С этим предположением согласуются результаты работ, продемонстрировавших сохранение чувствительности лимфоцитов к преднизолону при лечении больных ревматоидным артритом по экстракорпоральной схеме [6], восстановление пролифе-



ративного ответа Т-клеток и выведение их из состояния анергии при экстракорпоральной терапии больных гнойно-септическими заболеваниями [7]. Дальнейшие исследования в этом направлении помогут раскрыть механизмы передачи иммуномодулирующей информации от модифицированных клеток к интактным и на этой базе разработать научно-обоснованные подходы к применению экстракорпоральных методов иммунокоррекции.

#### **Выводы:**

1. Обработанные фармакотерапевтическими средствами и лазерным излучением МНК в условиях их совместного культивирования с интактными клетками обладают выраженным иммуномодулирующим действием на экспрессию E-рецепторов и HLA-DR-антигена на лимфоцитах и метаболическую активность нейтрофилов. Эффект обработанных МНК не соответствует по направлению и значительно превосходит по выраженности прямое действие иммуномодуляторов на клетки.
2. Обработанные лазерным излучением или стафилококковым анатоксином МНК усиливают

спонтанную и ЛПС-стимулированную продукцию ФНОα в культуре аутологичных мононуклеаров здоровых лиц.

3. Реализация иммуномодулирующего действия обработанных МНК происходит только в условиях межклеточного взаимодействия между модифицированными и интактными лимфоцитами или нейтрофилами.

4. В супернатантах смешанных культур обработанных стафилококковым анатоксином или лазерным излучением и интактных лимфоцитов происходит накопление растворимых факторов, изменяющих способность аутологичных нейтрофилов к спонтанной миграции и усиливающих продукцию лимфоцитами фактора, подавляющего миграцию лейкоцитов. Аналогичной активностью не обладают супернатанты монокультур обработанных и интактных лимфоцитов.

5. Факторы супернатантов смешанных культур обработанных иммуномодуляторами и интактных МНК повышают чувствительность нейтрофилов к экзогенным иммуномодуляторам.

#### **ЛИТЕРАТУРА:**

1. Говалло В.И., Барановская В.Г., Балакирева Л.З. Исследования розеткообразующей и пролиферативной способности лимфоцитов крови при их облучении волнами миллиметрового диапазона // Миллиметровые волны в медицине. – М., 1991. – С.198.
2. Лесков В.П., Гуцин И.С. Экстракорпоральная иммунофармакотерапия // Пульмонология.-1993.- N3.-С.17-19.
3. Новиков Д.К., Новикова В.И. Клеточные методы иммунодиагностики.-Минск:Беларусь,1979.-222с.
4. Новиков Д.К., Мельникова Л.А., Гресь А.А. Влияние иммуномодуляторов различной природы на экспрессию маркеров Т-лимфоцитов in vitro // Иммунология. -1993.- N1.-С.28-30.
5. Новикова И.А., Новиков Д.К., Уланова Е.А., Булавкин В.П., Хотетовская Ж.В. Способ первичного скрининга химических соединений на иммуномодулирующую активность // Новые методы диагностики, лечения, реабилитации заболеваний и оценки лекарственных форм: Сб. науч. тр./ Витебский медицинский институт.—Витебск,1991.-С.23-25..
6. Новикова И.А., Булавкин В.П., Осадчий В.М., Уланова Е.А. Комплексная экстракорпоральная коррекция иммунологической недостаточности у больных хирургического и терапевтического профиля: Метод. рекомендации / Вит. гос. мед. университет.-Витебск,1999. - 15с.
7. Норкин М. Н., Леплина О.Ю., Тихонова М.А. и др. Роль апоптоза и анергии Т-клеток в патогенезе гнойно-септических заболеваний // Медицинская иммунология. – 2000. – Т.2, N 1. – С. 35-42.
8. Останин А.А., Пальцев А.В., Леплина О.Ю. и др. Опыт использования экстракорпоральной иммунотерапии в лечении хирургических больных с гнойно-септическими заболеваниями // Медицинская иммунология. – 2000. – Т.2, N 1. – С. 43-51.
9. Прозоровский Н.С., Лесков В.П., Гуцин И.С. Регуляторное действие мононуклеарных клеток человека, обработанных диуцифоном, может опосредоваться мембранной формой ИЛ-2 // Бюлл. эксперим. биол. и мед. –1991. – Т.111, N8.- С.174-176.
10. Юдина С.М., Гапонов А.М, Пирев В.М. Экстракорпоральная иммунофармакотерапия больных сепсисом и тяжелой гнойной инфекцией // Вестн.интенс.терапии.-1995.- N2.- С.44-48.
11. Юдина С.М., Снимщикова И.А., Неронов А.Ф. и др. Клинико-иммунологические аспекты экстракорпоральной иммунофармакотерапии (ЭИФТ) бронхиальной астмы и хронического бронхи-

- та // Int. J.Immunorehabilitation.-1997.-N5.-C.14.
12. Baechner R., Nathan D.G.Quantitative nitrobluetetrasolium test in chronic granulomatous disease // N. Engl. J. Med. - 1968.- Vol.278.- P. 971.
  13. Cheever M.A., Chen W. Therapy with cultured Tcells: Principles revisited // Immunol. Rev. – 1997. – N.157. – P. 177-194.
  14. Cheever M.A., Thompson J.A., Britzmann L.et al. Antigen-driven long-term cultured T-cell proliferate in vivo distribute widely, mediate specific tumor therapy and persist long-term as a functional memory T-cells // J.Exp.Med.-1986.-V.63-P.1100-1112.
  15. Harada M., Okamoto T., Omoto K. Et al. Specific immunotherapy with tumor-draining lymph node cells cultured with both anti-CD3 and anti-CD28 monoclonal antibodies // Immunology/ - 1996. – Vol.87, N 3. – P.447-453.
  16. Haruta I., Yamauchi K., Aruga A. Et al. Analytical study of the clinical response to two distinct adoptive immunotherapies for advanced hepatocellular carcinoma: comparison between LAK cell and CTL therapy // J. Immunother. Emphasis Tumor Immunol.- 1996.-Vol.19, N3.- H.218-223.
  17. Krauss J.S., Stein J.M. Shu S. Tumor reactivity of immune T-cells in short-term culture // Cancer Immunol.- 1996.-Vol.43, N 4. – P.231-239.

*Е.В.МАРКЕЛОВА,  
Ю.В. МАЙСТРОВСКАЯ,  
К.В. МАЙСТРОВСКИЙ,  
Т.А. ШУМАТОВА  
Владивостокский  
государственный  
медицинский  
Университет,  
Владивосток, Россия*

УДК: 616.24-006-008.7

## **ИССЛЕДОВАНИЕ ОКСИДА АЗОТА И ПЕРЕКИСИ ВОДОРОДА В КОНДЕНСАТЕ ПАРОВ ВЫДЫХАЕМОГО ВОЗДУХА ДЛЯ МОНИТОРИНГА РЕСПИРАТОРНОГО ДИСТРЕСС-СИНДРОМА ВЗРОСЛЫХ**

Была оценена степень информативности определения содержания оксида азота (NO) и перекиси водорода ( $H_2O_2$ ) в конденсате паров выдыхаемого воздуха (КПВВ) как биохимических маркеров для проведения мониторинга течения респираторного дистресс-синдрома взрослых (РДСВ).

Определение содержания метаболитов NO в КПВВ проводили методом спектрофотометрии с помощью реактива Грейса у 192 пациентов в различной стадии РДСВ. Для определения  $H_2O_2$  в КПВВ пациентов использовали метод флуоресценции.

Установлено повышение содержания метаболитов NO в КПВВ в 1 и 2 стадию РДСВ, сменяющееся резким снижением уровня NO в 3 и 4 стадию. Отмечено значительное нарастание концентрации  $H_2O_2$  при прогрессировании синдрома. При регрессе РДСВ на начальных этапах синтез NO уменьшается до показателей группы контроля, а повышение  $H_2O_2$  прекращается. Определение содержания метаболитов NO и  $H_2O_2$  является достаточно чувствительным и информативным тестом для диагностики стадии