

На правах рукописи

**ТКАЧЕВ**

**Виктор Олегович**

**АКТИВИРОВАННЫЕ КИСЛОРОДНЫЕ МЕТАБОЛИТЫ  
В РЕГУЛЯЦИИ Th1/Th2-ЗАВИСИМЫХ  
ПАТОЛОГИЧЕСКИХ ПРОЦЕССОВ**

**14.00.16 – патологическая физиология**

**14.00.36 – аллергология и иммунология**

**АВТОРЕФЕРАТ**

**диссертации на соискание ученой степени**

**кандидата биологических наук**

**Новосибирск – 2008**

Работа выполнена в ГУ Научный центр клинической и экспериментальной медицины СО РАМН (Новосибирск) и ГУ Научно-исследовательский институт клинической иммунологии СО РАМН (Новосибирск)

**Научные руководители:**

академик РАМН, профессор,  
доктор медицинских наук  
доктор биологических наук

Шкурупий Вячеслав Алексеевич  
Кудаева Ольга Тимофеевна

**Официальные оппоненты:**

доктор медицинских наук

Меньщикова Елена Брониславовна

доктор медицинских наук,  
профессор

Останин Александр Анатольевич

**Ведущая организация:** Государственное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Новосибирский государственный медицинский университет Федерального агентства по здравоохранению и социальному развитию» (Новосибирск).

Защита состоится «\_\_» \_\_\_\_\_ 2008 г. в \_\_\_\_ часов на заседании диссертационного совета Д 001.048.01 в ГУ Научный центр клинической и экспериментальной медицины СО РАМН по адресу: ул. Академика Тимакова, 2, г. Новосибирск, 630117  
тел/факс (8-383) 333-64-56

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ГУ Научный центр клинической и экспериментальной медицины СО РАМН.

Автореферат разослан «\_\_» \_\_\_\_\_ 2008 г.

Ученый секретарь  
диссертационного совета, д.б.н.

Пальчикова Н.А.

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**Актуальность темы.** В начале 70-х годов прошлого столетия [Babior V.M., et al., 1973], было показано, что резкое увеличение потребления молекулярного кислорода фагоцитами (получившее название «дыхательного взрыва») связано с интенсивной внутриклеточной продукцией кислородных радикалов, которые обеспечивают защиту организма от инфекционных агентов. Еще раньше была доказана важная роль активированных кислородных метаболитов (АКМ) в повреждении собственных тканей, например, при радиационных поражениях [Тарусов Б.Н., 1957], что привело к формированию понятия окислительного стресса – состояния, сопровождающегося увеличением продукции в клетках АКМ (а также радикалов неокислородной природы), и первоначально рассматривавшегося исключительно как деструктивное звено в механизме развития различных патологических состояний [Меньщикова Е.Б и др. 2006].

По современным представлениям, АКМ являются важными сигнальными молекулами, принимающими участие в регуляции разнообразных физиологических и патофизиологических процессов, включая такие фундаментальные как пролиферация, апоптоз и дифференцировка клеток, воспаление и регенерация тканей [Меньщикова Е.Б и др. 2006; Thannickal V.J., Fanburg B.L., 2000; Valko M., et al., 2007].

Установлено участие АКМ в регуляции функций иммунокомпетентных клеток. Особый интерес представляет их влияние на Th1/Th2-баланс в иммунной системе, который является базисным параметром регуляции иммунного ответа [Allen J.E., Maizels R.M., 1997; O'Gor D. et al., 2003]. Сложившаяся концепция о существовании «классического» и «альтернативного» механизмов активации макрофагов, ведущих к их дифференцировке в M1-, либо в M2-клетки, соответственно, связывает особенности метаболизма активных форм кислорода и азота в макрофагах и дендритных клетках с Th1/Th2-балансом в иммунной системе [Зенков Н.К. и др., 2007; Morris S.M.Jr, 1998; Mills C., et al., 2000; Mills C.D., 2001]. Активированные по классическому пути макрофаги (M1), характеризующиеся высоким уровнем продукции оксида азота (NO) и низким уровнем активности аргиназы – другого ключевого фермента метаболизма L-аргинина, – обладают способностью стимулировать клеточный иммунный ответ (Th1-зависимый). Макрофаги, активированные по альтернативному пути (M2), характеризующиеся

противоположными особенностями метаболизма L-аргинина, стимулируют гуморальный иммунный ответ (Th2-зависимый), а также процессы регенерации тканей.

Однако накопленные к настоящему времени экспериментальные данные об участии АКМ в Th1/Th2-девиации иммунного ответа имеют неполный и зачастую противоречивый характер. Следует отметить, что изучение роли АКМ в регуляции иммунного ответа *in vivo* является достаточно сложной научной задачей, требующей выбора адекватной экспериментальной модели.

Хроническая реакция трансплантат против хозяина (РТПХ) представляет собой иммунную реакцию, развивающуюся в результате трансплантации зрелых Т-лимфоцитов донора неспособному к их отторжению реципиенту в условиях их тканевой несовместимости [Шевелев А.С., 1976]. Хроническая РТПХ, индуцированная трансплантацией полуаллогенных лимфоидных клеток в системе DBA/2 → (C57Bl6xDBA/2)F1, может развиваться по двум вариантам, иммунопатологические особенности и проявления которых связаны с преимущественной активацией различных субпопуляций Т-клеток (Th1- и Th2-звена иммунной системы) [Кудаева О.Т., и др., 1992, Колесникова О.П., и др., 1999]. Таким образом, РТПХ-индуцированные иммунопатологические состояния могут быть использованы как чрезвычайно удобные тест-системы для изучения влияния различных фармакологических и нефармакологических воздействий на процессы Th1/Th2-регуляции иммунных процессов *in vivo*.

Одной из актуальных задач современной фармакологии является создание новых селективных иммуномодуляторов, способных дифференцированно воздействовать на Th1- и Th2-звенья иммунной системы. Целенаправленное изменение метаболического состояния иммунокомпетентных клеток может являться новым подходом в терапии заболеваний, связанных с нарушением Th1/Th2-баланса. Возможно, наиболее перспективной клеточной мишенью для такого иммуномодулирующего воздействия являются макрофаги, «дирижирующие» дифференцировкой Т-лимфоцитов.

В соответствии с вышеизложенным, были сформулированы цель и задачи настоящей работы.

**Цель исследования.** Целью работы было изучение роли активированных кислородных метаболитов в Th1/Th2-регуляции иммунного ответа.

### **Задачи исследования:**

1. Изучить влияние соединений, обладающих оппозитным влиянием на Th1/Th2-баланс в организме (мурамилдипептида (MDP) и дегидроэпиандростерона сульфата (DHEA-S)) на продукцию активных форм кислорода клетками иммунной системы, а также продукцию оксида азота и активность аргиназы в макрофагах *in vivo* и *in vitro*.
2. Исследовать продукцию активированных кислородных метаболитов, а также активность аргиназы при Th1- и Th2-зависимых иммунопатологических состояниях, индуцированных хронической РТПХ, в том числе при модуляции ее развития введением DHEA-S и MDP.
3. Изучить влияние окисленных химическим путем декстранов различной молекулярной массы, а также наноразмерных липосомальных биосовместимых композиций (далее – липосомальные композиции) на их основе на продукцию активированных кислородных метаболитов, а также активность аргиназы в иммунокомпетентных клетках.
4. Оценить воздействие окисленных декстранов различной молекулярной массы на Th1/Th2-поляризацию иммунного ответа *in vivo* на модели хронической РТПХ.
5. Исследовать влияние экзогенных про- и антиоксидантов (супероксидного радикала, перекиси водорода, супероксиддисмутазы и каталазы) на продукцию оксида азота и активность аргиназы в макрофагах *in vitro*.

**Научная новизна работы.** Впервые показано, что эндогенно продуцируемая макрофагами перекись водорода способствует поддержанию физиологического уровня аргиназной активности в этих клетках; удаление перекиси водорода каталазой приводит к ее снижению и, соответственно, к увеличению продукции оксида азота.

Установлено, что при Th1- и Th2-зависимых вариантах развития хронической РТПХ нейтрофилы периферической крови различаются по способности продуцировать супероксидный радикал. Важным признаком Th2-зависимого варианта хронической РТПХ является истощение «метаболических резервов» нейтрофилов, в связи с их неспособностью увеличивать продукцию АКМ в ответ на добавление стандартного стимулятора (продигиозана).

Получены данные о патогенетической связи классического и альтернативного механизмов активации макрофагов с Th1- и Th2-зависимыми РТПХ-индуцированными иммунопатологическими состояниями.

На модели хронической РТПХ показано изменение метаболического состояния иммунокомпетентных клеток фармакологическими агентами, модулирующими Th1/Th2-баланс *in vivo*. Введение MDP, обладающего способностью увеличивать продукцию активных форм кислорода и активировать макрофаги по альтернативному механизму, на начальных этапах развития хронической РТПХ сопровождается девиацией иммунного ответа сторону Th2-зависимых процессов. DHEA-S, обладающий противоположным действием на метаболизм АКМ и активирующий макрофаги по классическому пути, стимулирует Th1-зависимые иммунные реакции.

Впервые показана способность окисленных декстранов с молекулярной массой 35 и 60 кДа а также наноразмерных липосомальных композиций на их основе активировать макрофаги по классическому пути. Важным свойством окисленных декстранов является их способность активировать кислородный метаболизм лейкоцитов крови, сохраняя при этом «метаболические резервы» клеток.

**Теоретическая и практическая значимость работы.** Полученные в экспериментах *in vivo* данные на модели хронической РТПХ свидетельствуют о наличии тесной взаимосвязи Th1/Th2-баланса в организме с метаболическим состоянием иммунокомпетентных клеток. При этом существует обратная зависимость между уровнем продукции NO, с одной стороны, и уровнем продукции активных форм кислорода в клетках иммунной системы (прежде всего, продукции супероксидного радикала NAD(P)H-оксидазой), с другой. Полученные результаты расширяют имеющиеся представления о роли АКМ в функционировании иммунной системы и о механизмах, обеспечивающих Th1/Th2-регуляцию иммунного ответа.

Результаты работы обосновывают возможность создания фармакологических препаратов нового типа, предназначенных для иммунокоррекции различных патологических процессов, обусловленных нарушениями Th1/Th2-баланса, путем целенаправленного воздействия на метаболическое состояние клеток иммунной системы.

Экспериментально обнаруженная способность окисленных декстранов, а также наноразмерных гибридных липосомальных биосовместимых композиций, приготовленных на их основе, активировать макрофаги по классическом механизму позволяет

рекомендовать их для дальнейшего изучения в качестве перспективных иммуномодулирующих агентов.

**Основные положения, выносимые на защиту:**

1. При активации макрофагов существует функциональный антагонизм между ферментными системами, обеспечивающими продукцию супероксидного радикала и оксида азота.
2. Метаболическое состояние клеток иммунной системы, определяющее уровень продукции активных форм кислорода и оксида азота, является одним из регуляторов Th1/Th2-баланса в организме.
3. Окисленные декстраны, а также наноразмерные гибридные липосомальные биосовместимые композиции с ними, оказывают значимое модулирующее влияние на функции макрофагов, способствуя их активации по классическому механизму.

**Апробация работы.** Основные результаты работы были представлены на 7-й отчетной сессии ГУ НИ Института клинической иммунологии СО РАМН (2006 г.), Иммунологическом форуме РААКИ (г. Санкт-Петербург, 2007 г.), Объединенном иммунологическом форуме РААКИ и РНОИ (г. Санкт-Петербург, 2008 г.), Сибирском физиологическом съезде (г. Барнаул, 2008 г.).

**Публикации.** По материалам диссертации опубликовано 15 работ, из них 6 статей в в журналах, рекомендованных ВАК для публикации материалов диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук.

**Объем и структура диссертации.** Диссертация состоит из введения, обзора литературных данных, описания материала и методов исследования, 7 глав с описанием результатов собственных исследований с их обсуждением, заключения, выводов и библиографического указателя. Работа изложена на 149 страницах машинописного текста, иллюстрирована 38 рисунками и 13 таблицами. Список литературы включает 405 источника (22 отечественных и 383 зарубежных).

Работа выполнена в рамках ФЦП «Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технического комплекса России на 2007-2012 годы». Госконтракт № 02.513.11.3183 с использованием оборудования Центра коллективного пользования СО РАМН.

## **СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ**

### **Материал и методы исследования**

**Животные.** В работе использовали мышей – гибридов первого поколения (C57Bl/6xDBA/2)F1 (B6D2F1), самок; мышей линий

DBA/2, самок; полученных из экспериментально-биологической клиники лабораторных животных СО РАМН (г. Новосибирск), в возрасте 2 - 6 месяцев. Животных содержали в соответствии с правилами, принятыми Европейской конвенцией по защите животных, используемых для экспериментальных и иных научных целей (Страсбург, 1986).

*Органы, клетки и ткани* выделяли по стандартным методикам [Гольдберг Е.Д. и др., 1992].

*Индукцию хронической реакции трансплантат против хозяина* осуществляли у мышей путём переноса самкам (C57Bl6xDBA/2)F1 лимфоидных клеток родительской линии DBA/2. Клетки селезёнки, выделенные ex tempore, внутривенно вводили реципиентам в дозе  $65 \times 10^6$  клеток двукратно с интервалом в 5 дней [Kimura M. et al., 1987]. В качестве контроля использовали интактных животных того же генотипа, пола, возраста, что и в опыте, а также животных, которым аналогичным образом переносили сингенные клетки. О развитии Th2-зависимого варианта хронической РТПХ судили по появлению стойкой протеинурии (более 3 мг/мл).

*Количество белка в моче* определяли немедленно после ее получения колориметрически с красителем Cumassi Blue на длине волны 570 nm. Калибровочную кривую строили по BSA (100-1000 мкг/мл), результаты выражали в мг/мл.

*Супероксид-продуцирующую способность* нейтрофилов крови определяли в стандартном НСТ-тесте, используя 10 мкл периферической крови. В стимулированном тесте добавляли продигозан в конечной концентрации 0,001%. Результат выражали в процентах НСТ-позитивных клеток.

Для количественной оценки этого параметра в суспензии спленоцитов измеряли оптическую плотность ( $\lambda = 570$  nm) раствора формазана в диметилсульфоксиде после инкубации клеток с НСТ [Amano D. et al., 1975].

*Измерение внутриклеточного содержания перекиси водорода* проводили методом проточной цитометрии с использованием 2'7'-дихлорофлуоресцина диацетатом (DCFH DA) [Robinson J.P. et al., 2005]. Измерение интенсивности флуоресценции проводили на приборе FACSCalibur (BD, США). Результат выражали в интенсивности флуоресценции проб.

*Производство оксида азота* оценивали по содержанию нитритов (в мкМ) в супернатантах двухсуточных клеточных культур макрофагов, используя реактив Грисса [Green L.C. et al., 1982]. Макрофаги предварительно стимулировали липополисахаридом (LPS E. Coli



штамм В5:055) в конечной концентрации 10 мкг/л или LPS в сочетании с интерфероном-гамма (IFN- $\gamma$ ), источником которого служил супернатант аллогенной смешанной культуры лимфоцитов.

*Активности аргиназы* определяли по скорости образования мочевины из экзогенного L-аргинина с использованием  $\alpha$ -изонитропропиофенона [Corraliza I.M. et al., 1994].

*Статистическую обработку экспериментальных данных* проводили с использованием непараметрического критерия Манна–Уитни и коэффициента ранговой корреляции Спирмена. Отличия между сравниваемыми величинами показателей считали статистически значимыми при  $p < 0,05$ . На рисунках статистически значимые различия между экспериментальной и контрольной группой отмечали знаком \* ( $p < 0,05$ ) и \*\* ( $p < 0,01$ ); между экспериментальными группами - # ( $p < 0,05$ ) и ## ( $p < 0,01$ ).

### Результаты исследования и их обсуждение

**Использование хронической РТПХ в качестве модели для изучения роли АКМ в регуляции иммунного ответа *in vivo***

Реакция трансплантат против хозяина, индуцированная в полуаллогенной системе DBA/2  $\rightarrow$  (C57Bl6xDBA/2)F1 развивается по хроническому типу в силу иммунологических особенностей мышей линии DBA/2 [Rus, 1995]. Показано существование двух ее оппозитных вариантов, частота развития которых определяется, главным образом, Th1/Th2-балансом в иммунной системе [Козлов В.А., и др., 2002; Кудаева О.Т., и др., 2004]. В настоящее время не известны критерии, позволяющие разделять эти варианты на ранних сроках после индукции хронической РТПХ, лишь через 2-3 месяца у мышей с Th2-зависимым вариантом хронической РТПХ выявляют стойкую протеинурию, свидетельствующую о развитии аутоиммунного гломерулонефрита.

В контроле аутоиммунное поражение почек было выявлено у 50-60% мышей, а Th1-зависимый вариант развивался, соответственно, в 40-50% случаев. При действии препаратов, сдвигающих Th1/Th2-баланс, это соотношение изменяется. Так, введение DHEA-S приводит к доминированию Th1-, а MDP – Th2-зависимого варианта хронической РТПХ [Кудаева О.Т. и др., 2005].

**Продукция супероксидного радикала в динамике хронической РТПХ и при ее модуляции DHEA-S и MDP**

Активность продукции супероксидного радикала нейтрофилами крови на поздних сроках хронической РТПХ зависит от ее иммунопатологического варианта. При Th1-варианте спонтанная и

активированная продигиозаном продукция супероксидного радикала не отличается от контроля. При Th2-зависимом варианте развития хронической РТПХ отмечено снижение спонтанной продукции супероксидного радикала в НСТ-тесте, а также отсутствие прироста продукции  $O_2^-$  в ответ на активирующий стимул (продигиозан) (Рис. 1). Это указывает на вовлечение в процесс продукции АКМ всех способных к этому нейтрофилов в результате действия избытка активирующих факторов (которыми, в данных условиях, могут быть аутоантитела и циркулирующие иммунные комплексы) на фоне возникающих дефектов супероксид-генерирующей системы лейкоцитов экспериментальных животных с аутоиммунным гломерулонефритом. Обнаруженные нарушения ферментативных систем, обеспечивающих продукцию супероксидного радикала могут трактоваться как истощение «метаболических резервов» нейтрофилов вследствие избыточной активации метаболизма кислорода, которая происходит на ранних сроках после индукции хронической РТПХ.

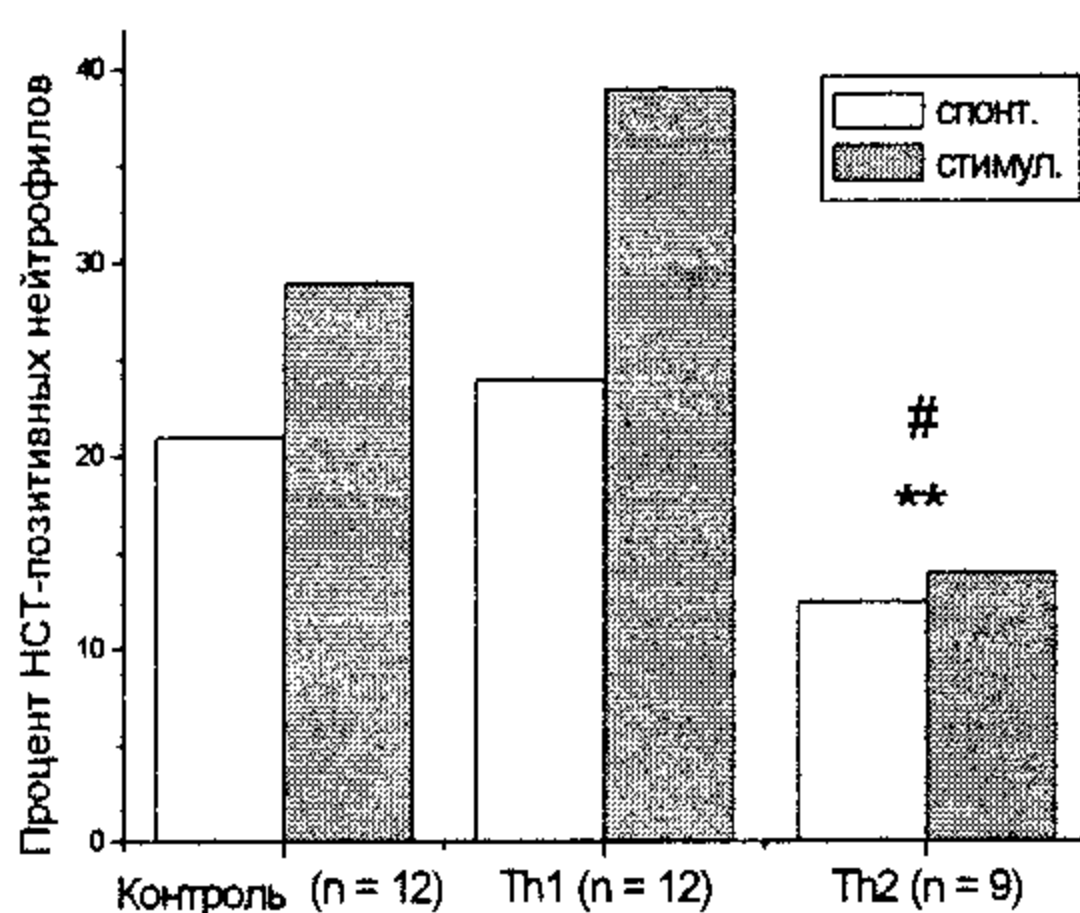


Рис. 1. Продукция супероксидного радикала нейтрофилами крови при различных вариантах хронической РТПХ

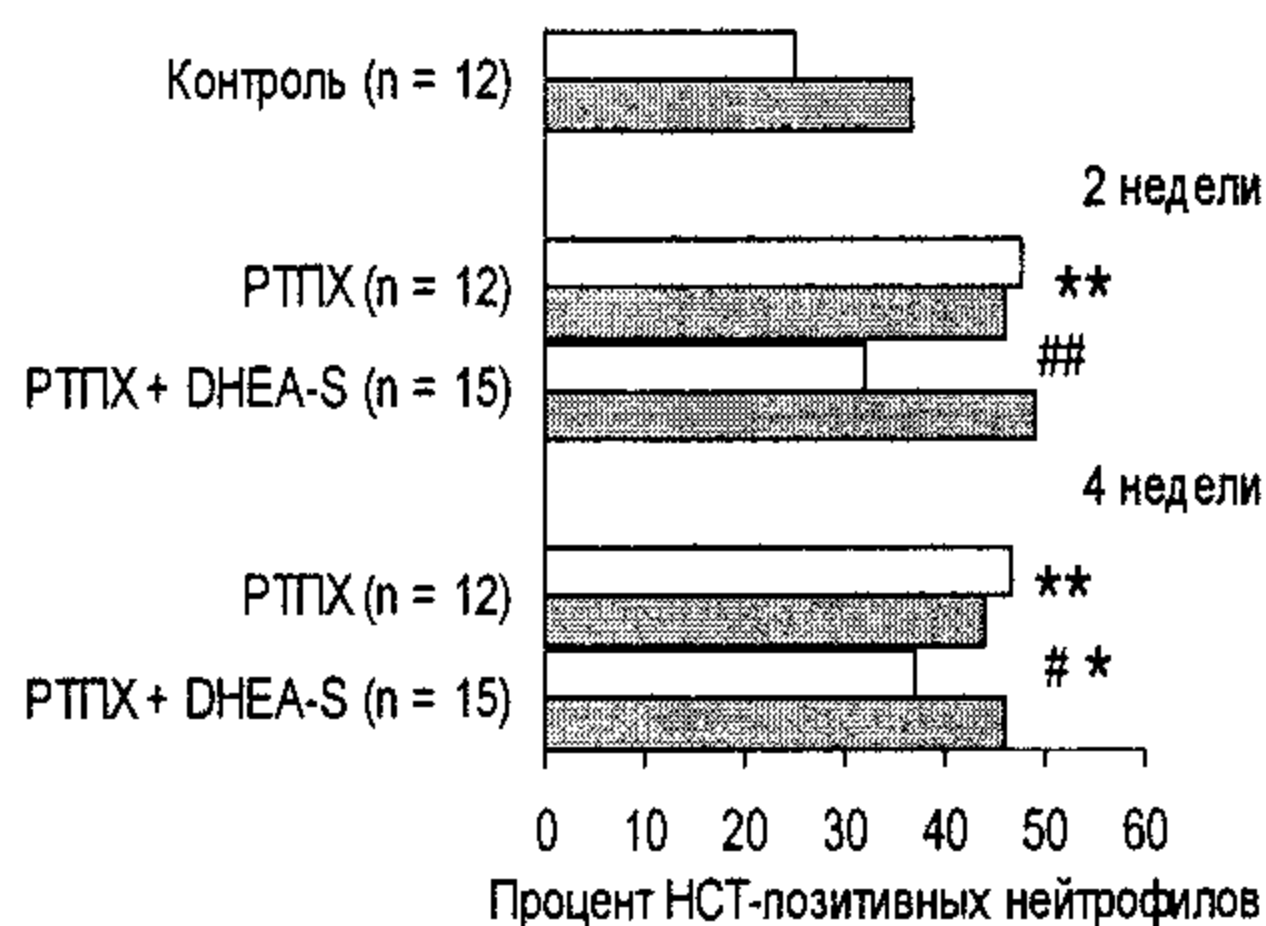


Рис. 2. Продукция супероксидного радикала нейтрофилами крови при модуляции хронической РТПХ DHEA-S

Курсовое введение DHEA-S (четырекратно в разовой дозе 38 мг/кг массы тела) в фазу индукции снижает спонтанную продукцию супероксидного радикала нейтрофилами, тогда как продигиозан-стимулированная продукция  $O_2^-$  не изменяется (Рис. 2).

При модуляции развития хронической РТПХ курсовым введением мурамилдипептида на ранних сроках реакции (двукратно, в дозе 1 мг/кг массы тела) отмечена тенденция к увеличению продукции супероксидного радикала нейтрофилами.

Полученные данные свидетельствуют, что метаболическая активация нейтрофилов на ранних сроках развития хронической РТПХ связана с поляризацией иммунных процессов в Th2-сторону.

### Продукция оксида азота и активность аргиназы в перитонеальных макрофагах при хронической РТПХ

На ранних этапах развития хронической РТПХ уровень продукции оксида азота подвержен значительным колебаниям в зависимости от времени, прошедшего с момента начала индукции. Спустя 48 часов после первой и второй трансплантации лимфоидных клеток отмечено увеличение продукции NO. Активность аргиназы имела тенденцию к снижению во всех контрольных точках. Выявленная динамика изменений NO-синтазной и аргиназной активности макрофагов может быть связана с изменениями концентраций про- и противовоспалительных цитокинов в сыворотке крови в процессе развития хронической РТПХ [Garlisi C.G., et al., 1993, Rus V., et al., 1995].

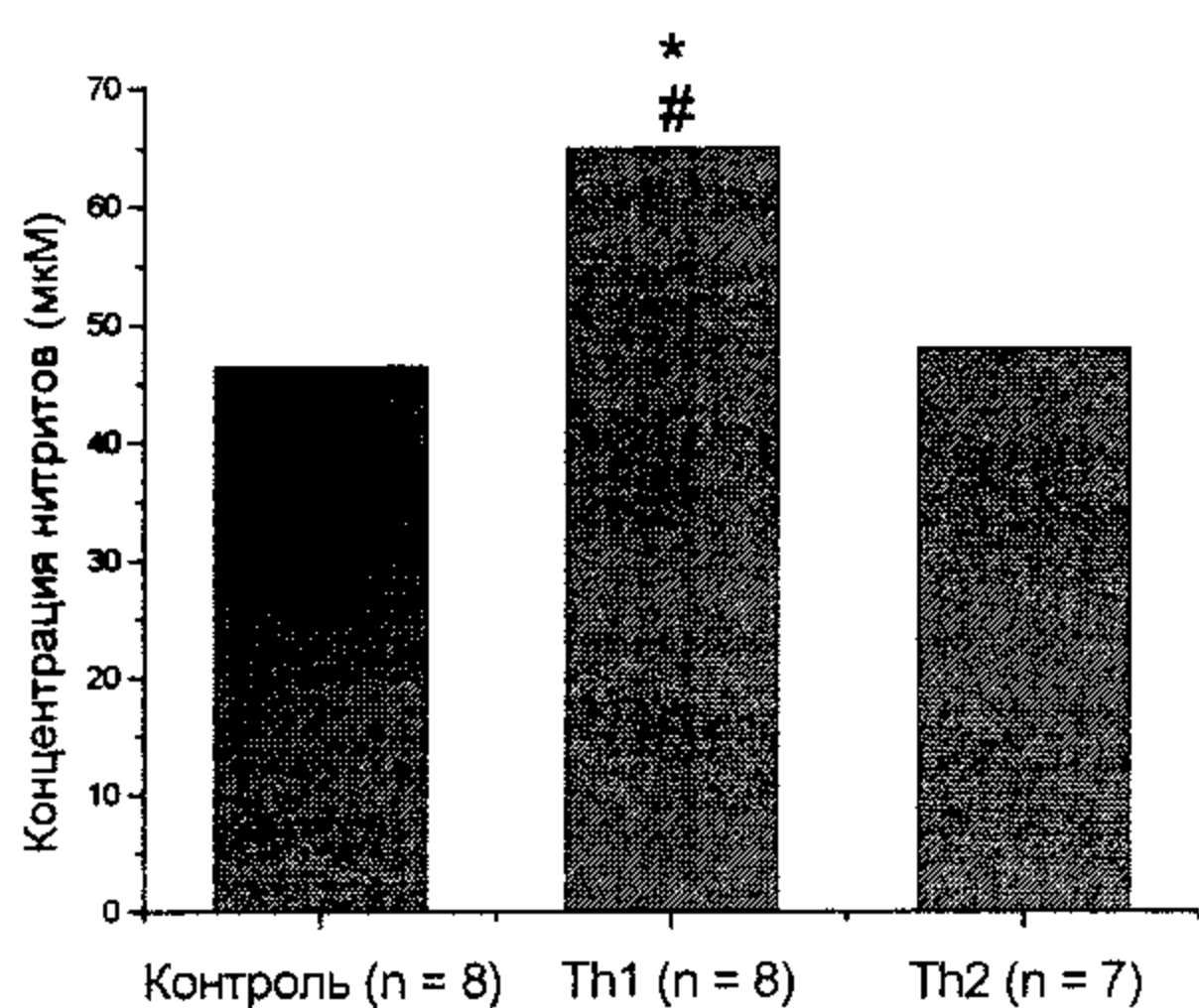


Рис. 3. LPS/Ifn-стимулированная продукция оксида азота при Th1- и Th2-зависимом вариантах хронической РТПХ

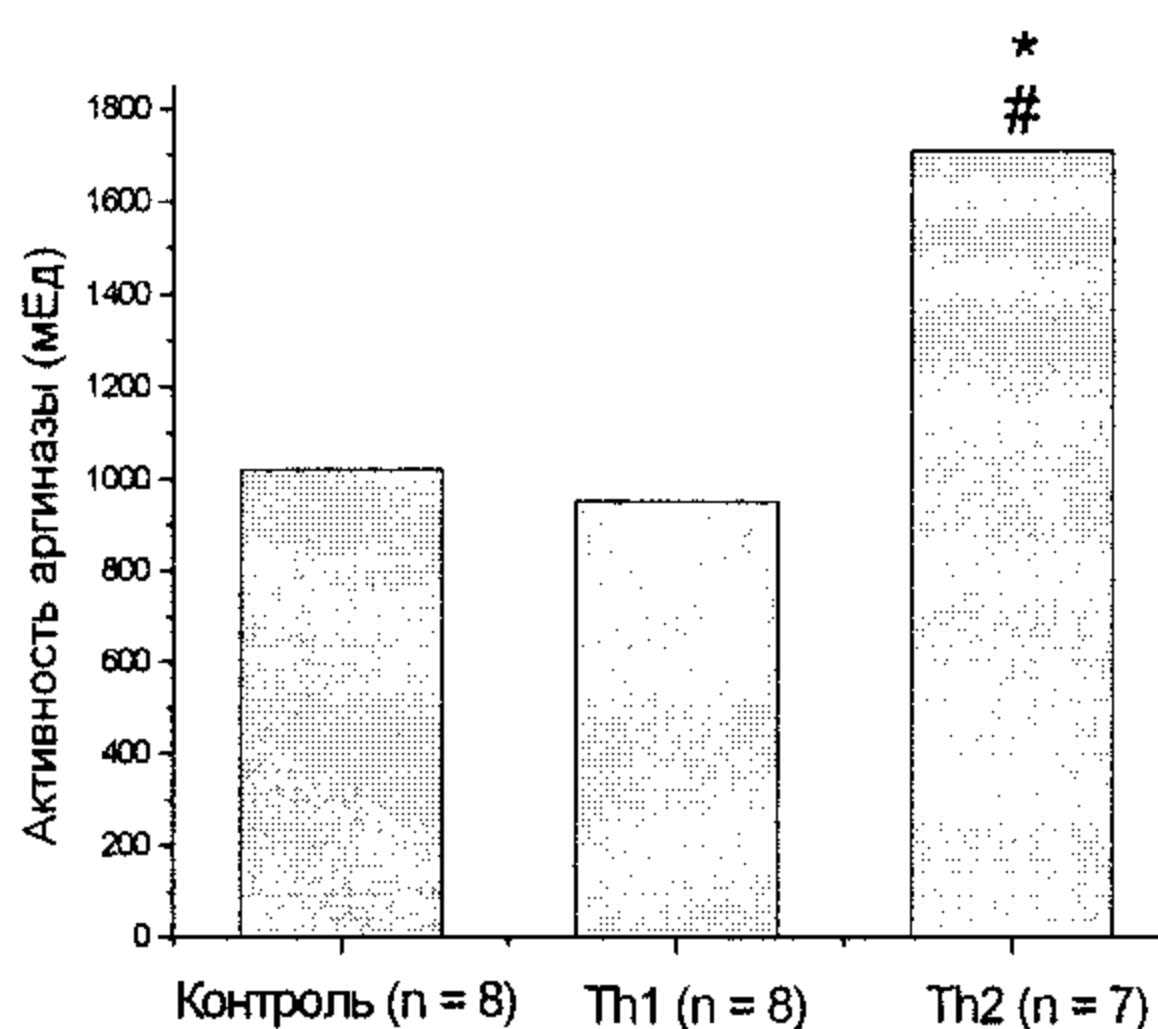


Рис. 4. Активность аргиназы при Th1- и Th2-зависимом вариантах хронической РТПХ

При Th1-зависимом варианте развития хронической РТПХ отмечено увеличение LPS/IFN- $\gamma$ -стимулированной продукции оксида азота перитонеальными макрофагами, что свидетельствует об их активации по классическому механизму (Рис. 3). При Th2-зависимом РТПХ-индуцированном иммунопатологическом состоянии увеличивается активность аргиназы (Рис. 4), что характерно для альтернативно активированных макрофагов.

Использование в качестве объекта исследования перитонеальных макрофагов позволяет сделать вывод, что обнаруженные различия в метаболизме аргинина в иммунокомпетентных клетках носят системный, универсальный характер, и не могут быть обусловлены собственно наличием иммунного воспаления ткани почек при Th2-варианте хронической РТПХ. Альтернативная активация макрофагов при этом может быть вызвана циркулирующими иммунными комплексами [Anderson C.F., Mosser D.M., 2002; Anderson C.F., Mosser D.M., 2002 (2)], образование которых характерно для Th2-зависимого иммунопатологического варианта хронической РТПХ, при этом изменение функциональных свойств макрофагов усиливает гуморальные иммунные реакции, что приводит к увеличению продукции аутоантител и, следовательно, вносит значительный вклад в развитие аутоиммунного гломерулонефрита.

Таким образом, активация макрофагов по классическому либо альтернативному механизмам играет важную роль в патогенезе Th1- и Th2-зависимых патологических состояний, вызванных хронической РТПХ.

#### **Влияние дегидроэпиандростерона сульфата и мурамилдипептида на продукцию активных форм кислорода клетками иммунной системы**

Исходя из полученных данных об оппозитном влиянии DHEA-S и MDP на Th1/Th2-баланс в иммунной системе, представляло интерес оценить их влияние на продукцию активных форм кислорода *in vitro* и *in vivo* клетками иммунной системы интактных мышей.

Спустя 2 часа после введения экспериментальным животным DHEA-S снижает спонтанную продукцию супероксидного радикала нейтрофилами, а спустя 6 часов - клетками селезенки, среди которых основными продуцентами  $O_2^-$  в НСТ-тесте являются макрофаги. Дегидроэпиандростерон не влияет на продукцию супероксидного радикала, стимулированную продигозаном. *In vitro* DHEA-S снижает внутриклеточную концентрацию перекиси водорода в перитонеальных макрофагах и спленоцитах (табл. 1), что также свидетельствует об инактивации супероксид-генерирующих клеточных систем, поскольку в клетках иммунной системы большая часть  $H_2O_2$  образуется в результате дисмутации  $O_2^-$  [Маянский А.Н., Маянский Д.Н., 1989; Меньщикова Е.Б., и др., 2006]. MDP *in vivo* усиливает продукцию супероксидного радикала нейтрофилами периферической крови, а *in vitro* увеличивает содержание  $H_2O_2$  в макрофагах и спленоцитах (см. табл. 1).

Таким образом, DHEA-S и MDP оказывают противоположное влияние на образование активных форм кислорода в различных типах клеток, участвующих в реализации иммунного ответа.

Таблица 1.

Влияние DHEA-S и MDP на внутриклеточное содержание перекиси водорода в перитонеальных макрофагах и спленоцитах (изменение интенсивности флуоресценции в процентах от соответствующего контроля)

Время инкубации с исследуемыми веществами	Перитонеальные макрофаги			Спленоциты		
	DHEA-S 200 мкМ	MDP 5 мкг/мл	MDP 10 мкг/мл	DHEA-S 200 мкМ	MDP 5 мкг/мл	MDP 10 мкг/мл
15 минут	98	177**	211**	82**	96	100
45 минут	72**	108	170**	75**	112	137**

#### **Влияние дегидроэпиандростерона сульфата и мурамилдипептида на продукцию оксида азота и активность аргиназы в макрофагах**

Поскольку ранее было показано, что Th1-зависимый иммунопатологический вариант хронической РТПХ сопровождается классической, а Th2-зависимый вариант - альтернативной активацией макрофагов, было изучено влияние DHEA-S и MDP на продукцию оксида азота и активность аргиназы в макрофагах, связанную с механизмом их активации [Morris S.M., et al., 1998; Munder M., et al., 1998]. Дегидроэпиандростерон сульфат *in vivo* увеличивает LPS-стимулированную продукцию оксида азота (Рис. 5), а *in vitro* существенно ингибирует активность аргиназы (Рис. 6).

Мурамилдипептид *in vitro* увеличивает спонтанную продукцию оксида азота, вероятно, за счет взаимодействия с TLR-рецепторами и активации MAPK/NF-κB-зависимых сигнальных путей [Weidemann B. et al., 1997], тогда как *in vivo* обладает противоположным эффектом – увеличивает активность аргиназы в перитонеальных макрофагах (на 44%).

Таким образом, DHEA-S (*in vitro* и *in vivo*) и MDP (*in vivo*) способствуют активации макрофагов по классическому либо альтернативному механизмам, соответственно.

Полученные данные свидетельствуют, что продуцируемые клетками иммунной системы АКМ, в частности супероксидный радикал и оксид азота, играют важную роль в регуляции Th1/Th2-

баланса в организме, что создает предпосылки к созданию новых типов иммуномодуляторов, селективно изменяющих метаболическое состояние иммунокомпетентных клеток. Мишенью такого терапевтического вмешательства могут являться макрофаги, обладающие мощными АКМ-генерирующими системами.

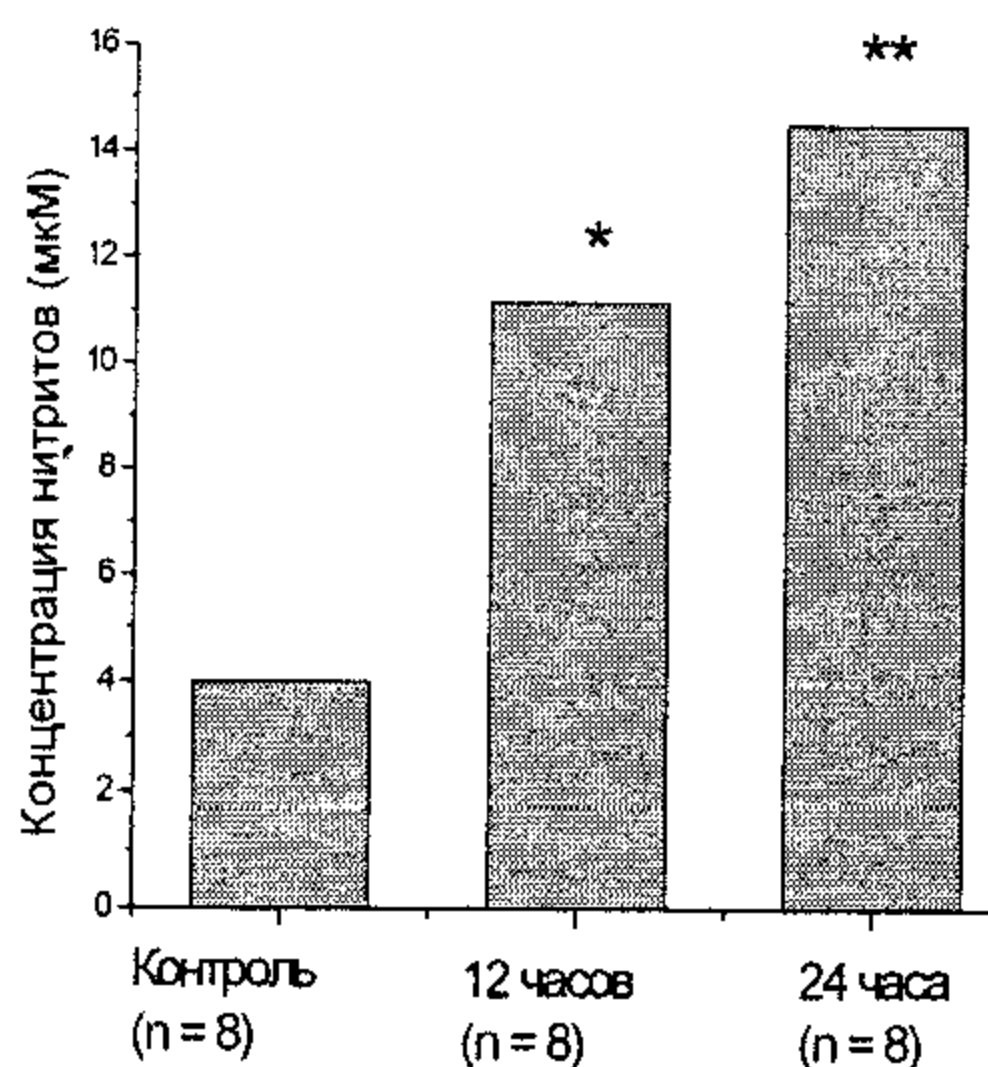


Рис. 5. Влияние DHEA-S на ЛПС-стимулированную продукцию NO *in vivo*

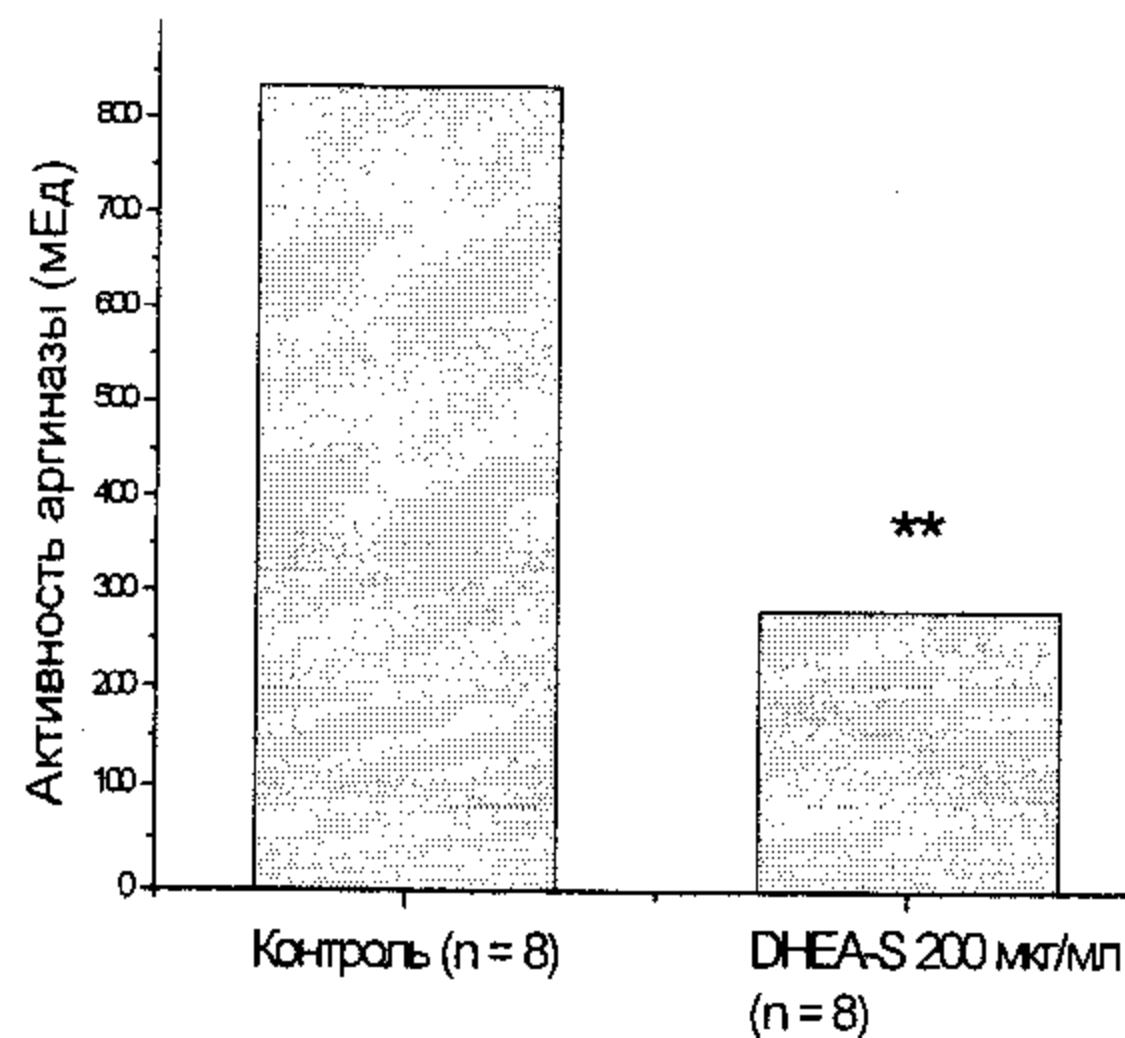


Рис. 6. Влияние DHEA-S на активность аргиназы *in vitro*

### Влияние окисленных декстранов и наноразмерных липосомальных биосовместимых композиций на их основе на метаболическое состояние макрофагов

Декстраны являются природными соединениями полисахаридной природы, которые эффективно фагоцитируются макрофагами и длительно находятся в лизосомальном аппарате клеток, активируя их защитные функции [Шкурупий В.А., 2008]. Окисление молекул декстрана приводит к появлению диальдегидных групп. Это позволяет присоединять к ним различные соединения, в том числе лекарственные средства, что обуславливает их возможное применение в качестве биоактивных матриц-носителей фармпрепаратов [Шкурупий В.А., 2008]. Однако окисление декстранов, изменяющее их структуру, может приводить к изменению их биологических свойств. Исходя из этого, были исследованы влияния окисленных декстранов, а также наноразмерных липосомальных биосовместимых композиций на их основе на функциональную активность клеток иммунной системы.

**Влияние окисленных декстранов на продукцию супероксидного радикала нейтрофилами *in vivo*.** Окисленные декстраны с молекулярными массами 35 (OxDex-35) и 60 кДа (OxDex-60) вводили внутривенно интактным мышам (C57Bl6xDBA/2)F1 в дозе 50 мг/мышь в виде 10% водных растворов. Установлено, что спустя 8

часов после введения окисленные декстраны усиливают спонтанную и стимулированную продигиозаном продукцию супероксидного радикала нейтрофилами периферической крови в НСТ-тесте (табл. 2).

Таблица 2.

Показатели спонтанного/стимулированного продигиозаном НСТ-теста у мышей BDF1 после введения окисленных декстранов *in vivo*

Время после введения препаратов	Группы животных		
	Физ. раствор	OxDex-35	OxDex-60
2 часа	24,8/41,5	26/43,6	28/46
8 часов	28,5/37	40,2*/60,5*	49,6*/61*
24 часа	32,2/45	27,6/34,6	29,4/40,4
48 часов	30,5/41,7	30,8/44,2	34,6/44,6

Увеличение продигиозан-стимулированной продукции АКМ на фоне предварительной активации нейтрофилов окисленными декстранами свидетельствует о сохранении «метаболических резервов» лейкоцитов, то есть об активации метаболических путей, направленных на поддержание субстратного обеспечения АКМ-генерирующих систем клеток. Полученные результаты свидетельствуют в пользу того, что внутрибрюшинное введение окисленных декстранов различной молекулярной массы приводит к системным изменениям в организме. В то же время продукция  $O_2^-$  спленоцитами не стимулируется окисленными декстранами в аналогичных условиях.

***Влияние окисленных декстранов и липосомальных композиций на продукцию оксида азота и активность аргиназы в макрофагах *in vitro*.*** Поскольку декстраны обладают особой тропностью к клеткам системы мононуклеарных фагоцитов и способны их активировать, представляло интерес исследовать их влияние на метаболизм L-аргинина в макрофагах в условиях *in vitro*. В опытах *in vitro* окисленные декстраны добавляли к культурам перитонеальных макрофагов, выделенных от интактных мышей (C57Bl6xDBA/2)F1, в нетоксичных конечных концентрациях 0,16 и 0,25 г/л [Шкурупий В.А. и др., 2008].

В условиях *in vitro* OxDex-35 в дозе 0,25 г/л достоверно увеличивает LPS-стимулированную продукцию оксида азота перитонеальными макрофагами, повышая ее в 3,5 раза. OxDex-60 *in vitro* не изменяет LPS-стимулированную продукцию оксида азота и снижает на 20% LPS/IFN- $\gamma$ -стимулированную продукцию NO, что

может быть обусловлено активацией супероксид-генерирующих ферментативных систем. В тех же условиях окисленные декстраны вне зависимости от их молекулярной массы снижают активность макрофагальной аргиназы (Рис. 7).

Культивирование макрофагов в присутствии липосомальных композиций, приготовленных на основе окисленных декстранов, увеличивает спонтанную продукцию оксида азота клетками (Рис. 8).

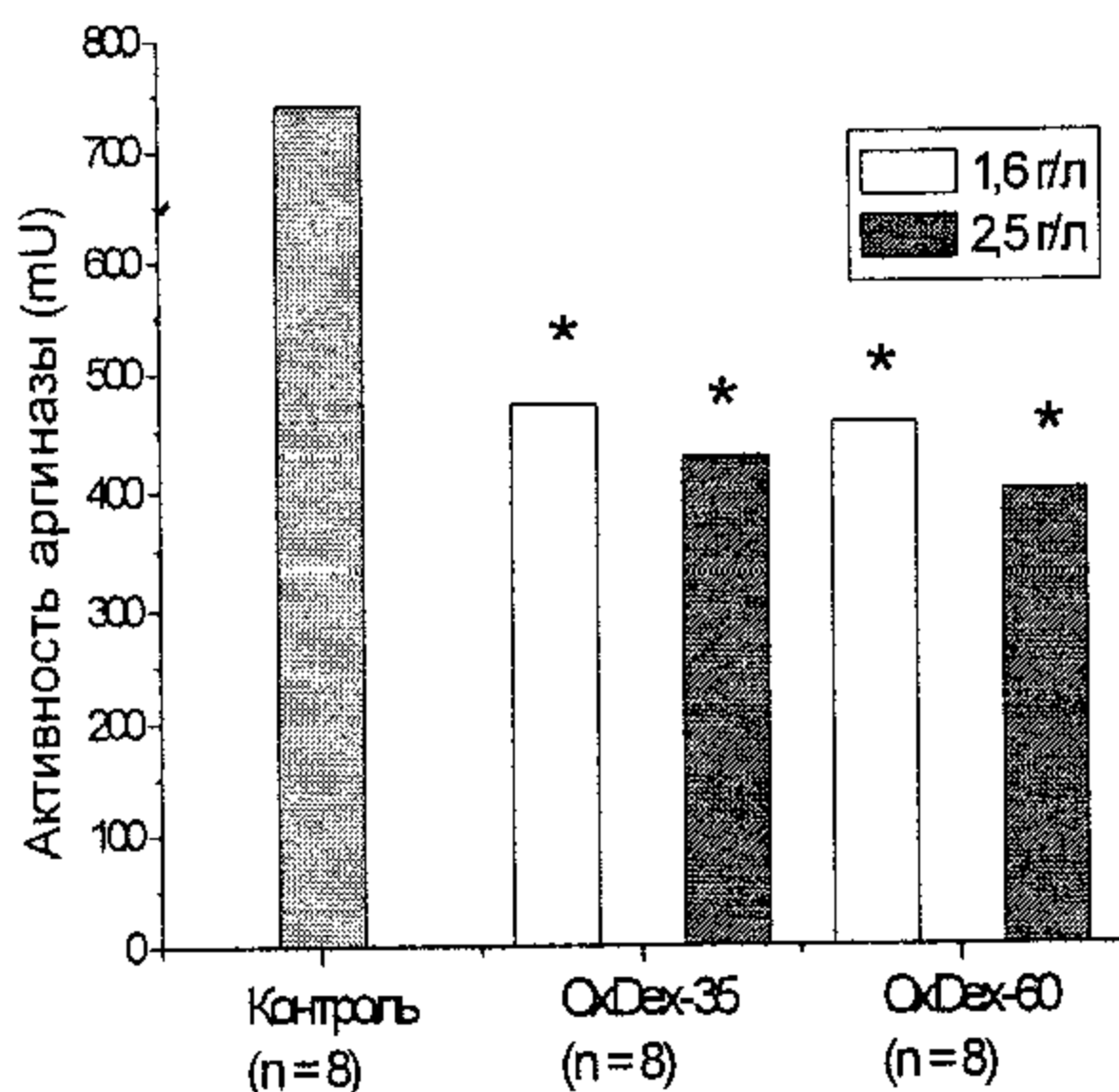


Рис. 7. Влияние окисленных декстранов на активность аргиназы *in vitro*

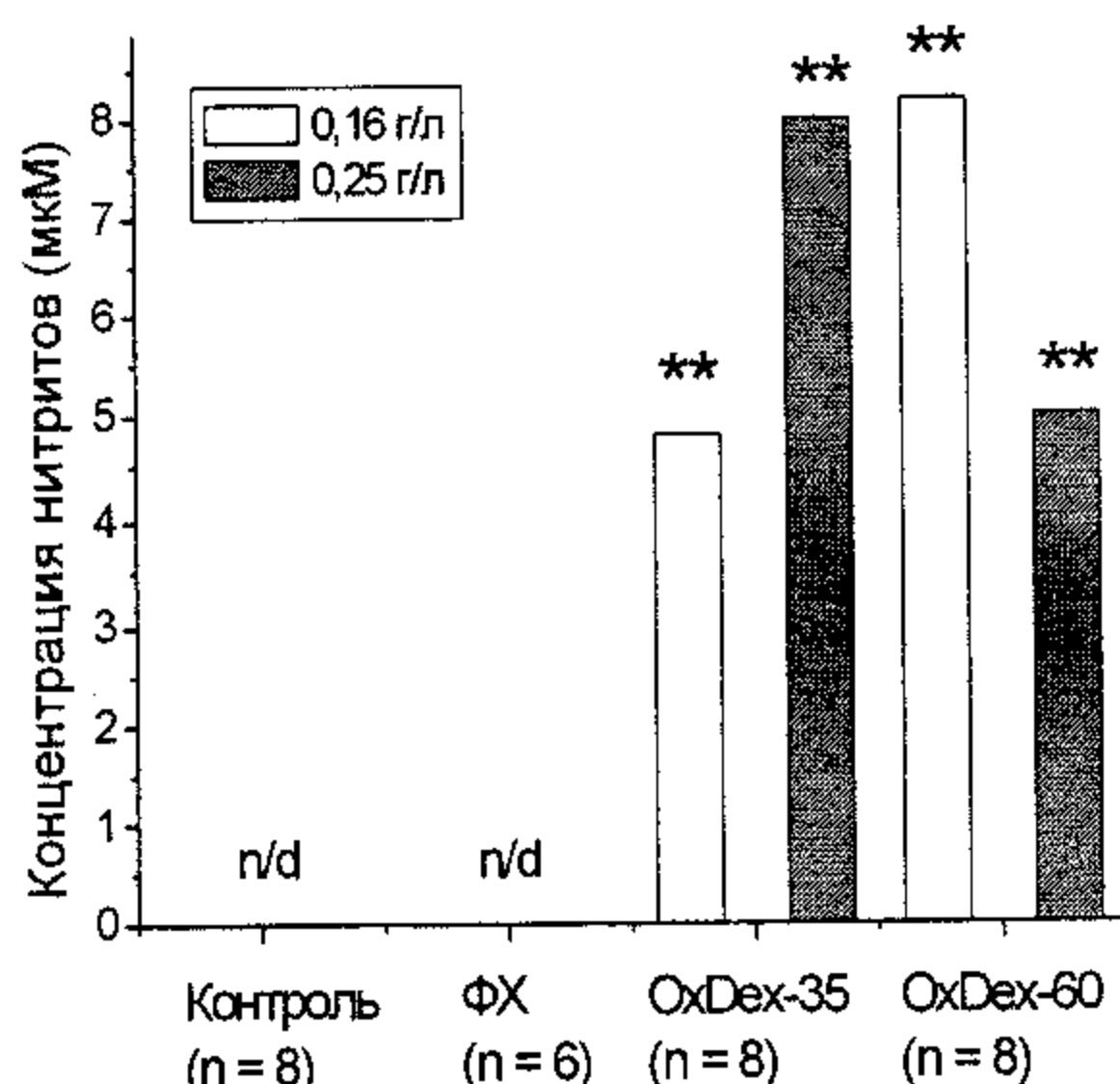


Рис. 8. Влияние наносомальных форм окисленных декстранов на спонтанную продукцию оксида азота *in vitro*

Также липосомальная форма OxDex-35 в концентрации 0,25 г/л усиливает LPS-стимулированную продукцию (на 27%), а липосомальная форма OxDex-60 в концентрации 0,16 г/л усиливает LPS/IFN- $\gamma$ -стимулированную продукцию оксида азота (на 58%). Фосфатидилхолин, используемый для приготовления композиций, на синтез NO не влияет. Включенные в нанолипосомы окисленные декстраны различной молекулярной массы, равно как и суспензия фосфотидилхолина, не изменяют активность аргиназы в перитонеальных макрофагах при культивировании клеток с указанными соединениями в течение 24 и 48 часов.

Таким образом, эффект окисленных декстранов *in vitro* существенно зависит от их молекулярной массы, а включение их в наноразмерные липосомальные композиции заметно изменяет их активность. Подводя итог, можно отметить, что исследуемые производные декстранов, в целом, способствуют активации макрофагов по классическому механизму. Это указывает на то, что использование окисленных декстранов в качестве биоактивных



матриц-носителей лекарственных средств или же в качестве самостоятельных фармакологических агентов может иметь широкие перспективы в терапии ряда заболеваний различной природы, связанных с нарушением процессов иммунорегуляции. Включение окисленных декстранов в состав липосом может изменить их фармакокинетические свойства, повысив их тропность к клеткам системы мононуклеарных фагоцитов, что чрезвычайно важно для адресной доставки фармакологических агентов в очаг воспаления, с сохранением в целом их активирующего влияния на макрофаги.

*Влияние окисленных декстранов на Th1/Th2-поляризацию иммунного ответа на модели хронической РТПХ in vivo.* Вышеописанные эффекты окисленных декстранов позволяют предполагать у них наличие иммуномодулирующих свойств, в частности, способности оказывать влияние на Th1/Th2-поляризацию иммунного ответа in vivo. Однако на модели хронической РТПХ было установлено, что декстраны, вводимые экспериментальным животным в фазе индукции (двукратно, в суммарной дозе 100 мг/мышь), не приводят к изменению частоты развития ее Th1- и Th2-зависимых иммунопатологических вариантов.

*Влияние окисленных декстранов и липосомальных композиций с ними на продукцию оксида азота и активность аргиназы в макрофагах in vivo.* Поскольку отсутствие ожидаемых иммуномодулирующих эффектов окисленных декстранов in vivo противоречит их способности активировать макрофаги in vitro, было исследовано их влияние на макрофаги интактных животных in vivo. Спустя 24 часа после введения окисленных декстранов с молекулярными массами 35 и 60 кДа отмечали пик продукции оксида азота макрофагами, которая при этом возрастает до уровня, достигаемого активацией NO-синтазы макрофагов сочетанием LPS и IFN- $\gamma$  (Рис. 9). OxDex-35 при этом является более эффективным активатором продукции NO in vivo по сравнению с OxDex-60. Введение окисленных декстранов экспериментальным животным также увеличивает продукцию оксида азота, стимулированную LPS в сочетании с IFN- $\gamma$ .

Таким образом, выявленные in vitro эффекты окисленных декстранов на продукцию оксида азота сохраняются и в условиях in vivo, но было установлено, что их влияние на активность аргиназы существенно различается в зависимости от условий эксперимента. OxDex-35 на активность этого фермента in vivo не влияет, тогда как OxDex-60 более чем в три раза увеличивает ее спустя 48 часов после введения препарата.

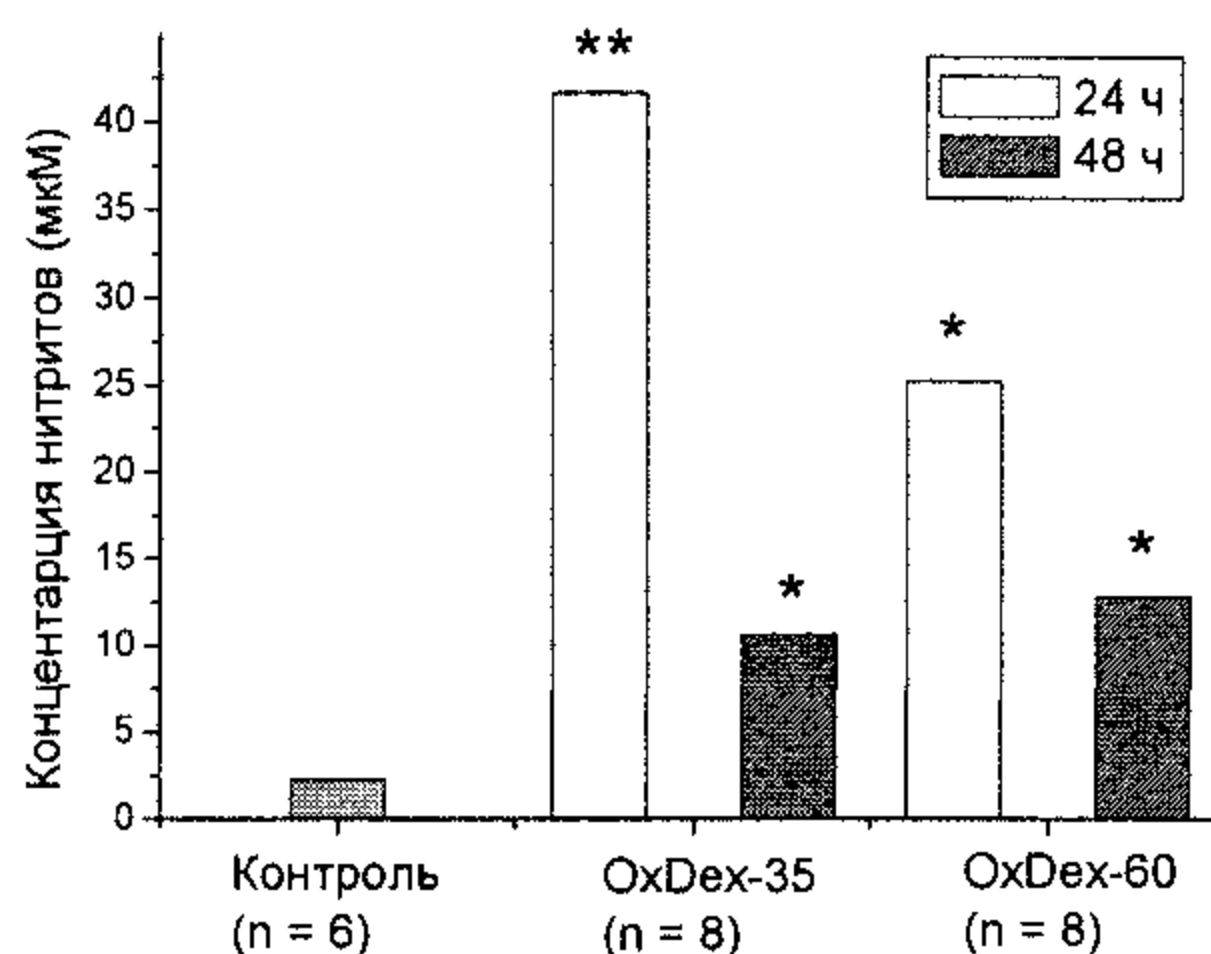


Рис. 9. Влияние окисленных декстранов на ЛПС-стимулированную продукцию оксида азота *in vivo*

Полученные данные указывают на то, что *in vivo* влияние окисленных декстранов на макрофаги зависит от каких-то еще неизученных факторов, и это до определенной степени объясняет видимое отсутствие их эффекта на Th1/Th2-поляризацию иммунного ответа в описанном выше эксперименте.

#### **Влияние экзогенных про- и антиоксидантов на продукцию оксида азота и активность аргиназы в макрофагах**

Для изучения связи окислительно-восстановительного клеточного баланса с активностью альтернативных путей метаболизма L-аргинина были исследованы влияния экзогенных про- и антиоксидантов на продукцию оксида азота и активность аргиназы в перитонеальных макрофагах интактных мышей линии (C57Bl6xDBA/2)F1 *in vitro*.

В качестве источника супероксидного радикала была использована система феназинметосульфат/восстановленный никотинамиддинуклеотид (PMS/NADH) [Van Noorden C.J., Butcher R.G., 1989; Rao U.M., 1989]. Было установлено, что увеличение продукции супероксидного радикала в результате дву- и трехкратного добавления к культуре макрофагальных клеток PMS/NADH снижает содержание нитритов в супернатантах клеточных культур (на 46 и 39%, соответственно), при этом активность аргиназы практически не изменяется. Супероксиддисмутаза (SOD), удаляющая O<sub>2</sub><sup>-</sup> из среды, но параллельно повышающая уровень H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, в дозе 500 Ед/мл, напротив, увеличивает содержание нитритов в супернатантах (на 56% по сравнению с контролем), не влияя на активность аргиназы.

Перекись водорода, добавляемая к клеточным культурам однократно, в концентрации 100 нМ усиливает продукцию оксида азота. Активность аргиназы под влиянием экзогенной перекиси

водорода в исследованных концентрациях (10 нМ – 1 мкМ) не изменяется. В то же время, каталаза (Cat) дозозависимо снижает активность аргиназы в макрофагах (Рис. 10) и параллельно увеличивает продукцию NO (Рис. 11).

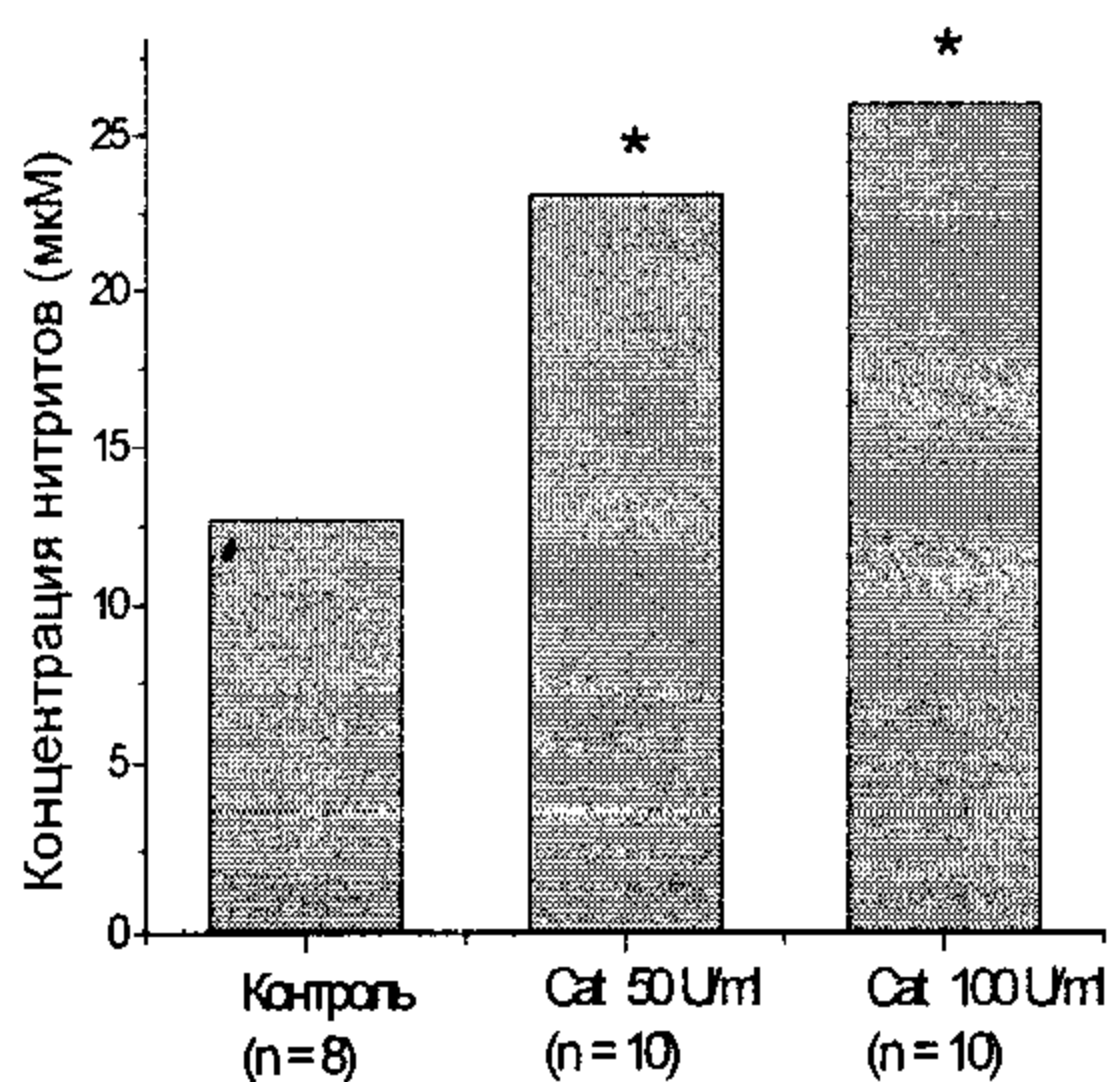


Рис. 10. Влияние каталазы (Cat) на продукцию оксида азота *in vitro*

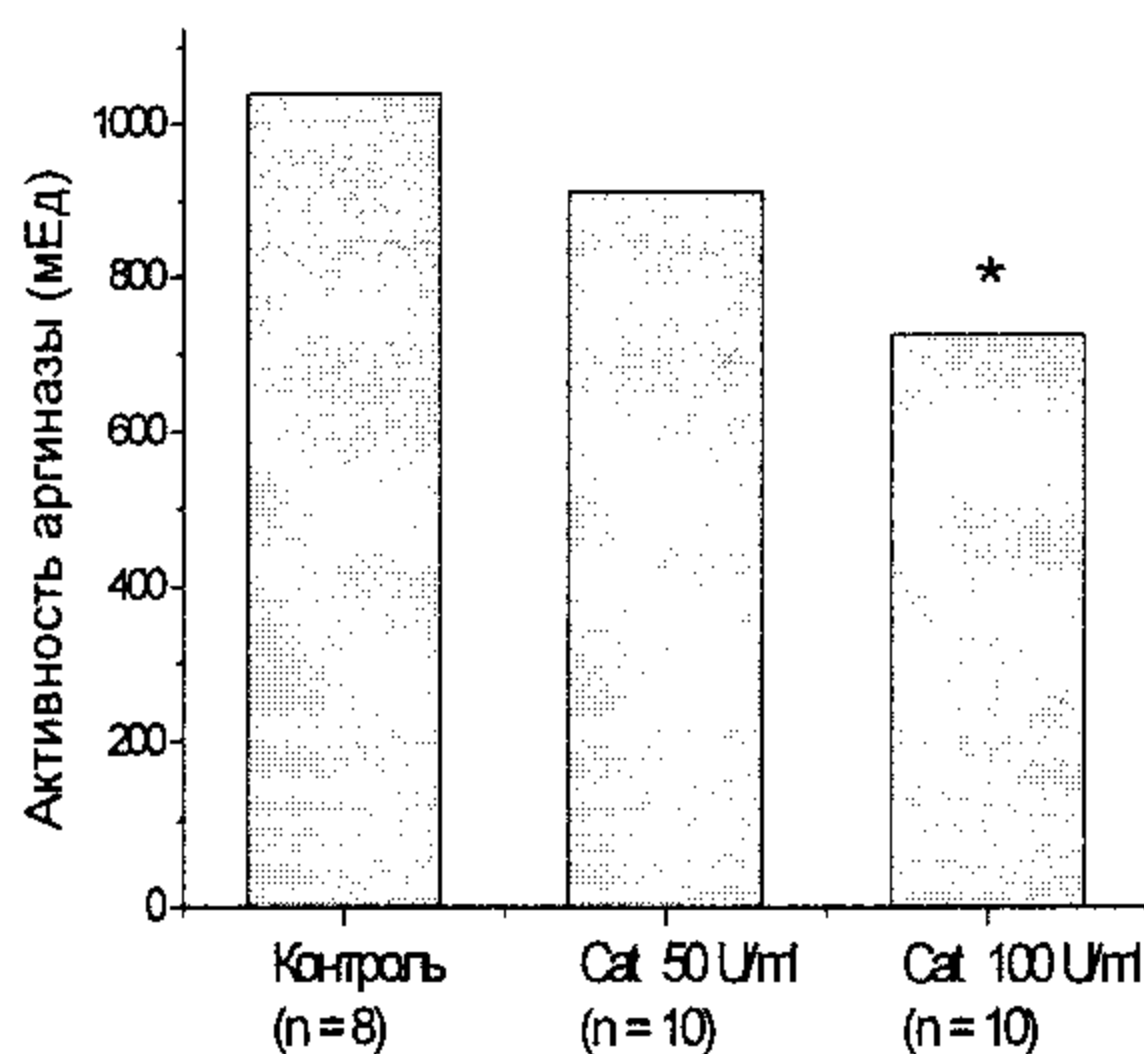


Рис. 11. Влияние каталазы (Cat) на активность аргиназы в макрофагах *in vitro*

Полученные данные позволяют сделать вывод, что супероксидный радикал сам по себе не влияет на активность NO-синтазы и аргиназы в перитонеальных макрофагах мышей, снижение содержания нитритов в супернатанте клеток может быть обусловлено образованием пероксинитрита в результате взаимодействия NO с  $O_2^{\cdot-}$ . В то же время, влияние клеточных систем, обеспечивающих продукцию супероксидного радикала на пути метаболизма L-аргинина в макрофагах могут быть опосредованы основным метаболитом  $O_2^{\cdot-}$  – перекисью водорода, эндогенная продукция которой в клетках является физиологическим механизмом регуляции аргиназной (и, следовательно, NO-синтазной) активности.

Таким образом, *in vitro* показано наличие обратной взаимосвязи между активностью супероксид-генерирующих ферментативных систем и продукцией оксида азота в макрофагах.

## ВЫВОДЫ

1. Активные формы кислорода и оксид азота оказывают оппозитное влияние на Th1/Th2-баланс при развитии РТПХ-индуцированных иммунопатологических состояний. Увеличение продукции супероксидного радикала и перекиси водорода способствует Th2-поляризации иммунного ответа, тогда как увеличение продукции

оксида азота макрофагами совпадает с их Th1-поляризирующим эффектом.

2. Активности аргиназы и NO-синтазы в перитонеальных макрофагах мышей зависят от внутриклеточной концентрации перекиси водорода, уменьшение содержания которой под влиянием экзогенной каталазы снижает аргиназную активность и увеличивает продукцию оксида азота. Снижение уровня NO в клетках под влиянием экзогенно продуцируемого супероксидного радикала не сопровождается активацией аргиназы, что свидетельствует в пользу ускоренной трансформации образующегося оксида азота в пероксинитрит.
3. Мурамилдипептид и дегидроэпиандростерон сульфат оказывают разнонаправленное влияние на активность АКМ-генерирующих систем и метаболизм L-аргинина в иммунокомпетентных клетках интактных животных. Мурамилдипептид увеличивает продукцию активных форм кислорода и активность аргиназы, тогда как дегидроэпиандростерон сульфат снижает продукцию активных форм кислорода и усиливает синтез оксида азота.
4. Развитие Th1-зависимого иммунопатологического варианта хронической РТПХ характеризуется активацией макрофагов по классическому механизму (с высоким уровнем продукции NO), а Th2-зависимого варианта – альтернативной активацией макрофагов (с повышенной активностью аргиназы).
5. Наблюдаемая на ранних этапах развития хронической РТПХ активация кислородного метаболизма нейтрофилов крови способствует формированию Th2-зависимого патологического состояния, что подтверждается в опытах *in vivo* Th1-поляризирующим эффектом DHEA-S, снижающего продукцию супероксидного радикала лейкоцитами экспериментальных животных.
6. Окисленные декстраны с молекулярной массой 35 и 60 кДа увеличивают продукцию супероксидного радикала нейтрофилами периферической крови *in vivo*.
7. Окисленные декстраны, а также наноразмерные липосомальные биосовместимые композиции, приготовленные на основе этих полисахаридов, активируют макрофаги по классическому механизму в опытах *in vitro*, что указывает на возможность их использования в качестве иммуномодуляторов.

### Список работ, опубликованных по теме диссертации

1. Уровень аутоантител к ДНК и метаболическая активность полиморфно-ядерных лейкоцитов в динамике хронической реакции трансплантат против хозяина / В.О. Ткачев, Е.В. Ненашева, Е.В. Гойман, Н.Н. Вольский, О.Т. Кудаева, О.П. Колесникова // Иммунология. – 2006. – Т. 27, № 2. – С. 98-101.
2. Показатели гемопоэза в динамике развития хронической реакции трансплантат против хозяина / В.О. Ткачев, Е.В. Гойман, А.П. Лыков, О.Т. Кудаева, О.П. Колесникова // Иммунология. – 2006. – Т.26, № 3. – С. 168-171.
3. Ткачев В.О. Показатели гемопоэза в динамике развития хронической реакции трансплантат против хозяина / В.О. Ткачев // Студент и научно-технический прогресс: Материалы XLIV международной научной конференции молодых ученых, секция Биология. – Новосибирск, 2006. – С. 113 - 114.
4. Ткачев В.О. Показатели развития аутоиммунного процесса в динамике развития хронической реакции трансплантат против хозяина / В.О. Ткачев // Студент и научно-технический прогресс: Материалы XLIV международной научной конференции молодых ученых, секция Медицина. – Новосибирск, 2006. – С. 16.
5. Ткачев В.О. Состояние кислородного метаболизма нейтрофилов крови характеризует особенности течения хронической РТПХ / В.О. Ткачев // Ломоносов – 2006: Сборник тезисов XII международной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых. - М., 2006. – С. 527-528.
6. Ткачев В.О. Состояние кислородного метаболизма нейтрофилов крови характеризует особенности течения хронической РТПХ / В.О. Ткачев, Н.Н. Вольский // Иммунопатогенез и иммунотерапия основных заболеваний человека: от эксперимента к клинике: Материалы 7-й отчетной конференции ГУ НИИКИ СО РАМН - Новосибирск, 2006. – С. 90-94.
7. Ткачев В.О. Патогенез хронической реакции «трансплантат против хозяина»: роль активных форм кислорода / В.О. Ткачев // Студент и научно-технический прогресс: Материалы XLV международной научной конференции, секция Биология. – Новосибирск, 2007. – С. 167-168.
8. Супрессирующее влияние дегидроэпиандростерона в условиях *in vivo* и *in vitro* на продукцию активированных кислородных метаболитов иммунокомпетентными клеткам мыши / О.М. Перминова, В.О. Ткачев, В.В. Сенюков, О.Т. Кудаева, Н.Н.

- Вольский // Бюллетень Сибирского отделения РАМН – 2007. - № 2. – С. 19-22.
9. Антиоксидантный эффект дегидроэпиандростерона сульфата и его влияние на Th1/Th2-баланс в опытах *in vivo* / Н.Н. Вольский, О.Т. Кудаева, О.М. Перминова, В.О. Ткачев, Е.В. Гойман, В.В. Сеньюков, Т.А. Обут, В.А. Козлов // Иммунология – 2007. – Т. 28, № 3. – С. 134-138.
  10. Роль активных форм кислорода в Th1/Th2-поляризации иммунного ответа / В.О. Ткачев, О.М. Перминова, Н.Н. Вольский, О.Т. Кудаева, В.А. Козлов // Медицинская иммунология. – 2007. – Т. 9, № 2-3. – С. 165-166.
  11. Ткачев В.О. Альтернативные варианты активации макрофагов при экспериментальных Th1- и Th2-зависимых иммунопатологических состояниях / В.О. Ткачев // Вестник Российской академии медицинских наук. – 2008. - № 6 (Прил. 1). – С. 435-436.
  12. Влияние дегидроэпиандростерона на продукцию оксида азота и активность аргиназы в макрофагах мыши / В.О. Ткачев, Н.Н. Вольский, О.Т. Кудаева, О.П. Колесникова // VI Сибирский физиологический съезд: Тезисы докладов. – Барнаул, 2008. – Т. 1. – С. 231.
  13. Альтернативные пути активации макрофагов при хронической РТПХ / В.О. Ткачев, О.М. Перминова, Н.Н. Вольский, О.Т. Кудаева, О.П. Колесникова, В.А. Козлов // Российский иммунологический журнал. – 2008. – Т. 2(11), № 2-3. – С. 239.
  14. Влияние окисленных декстранов на NO-синтазную и аргиназную активность макрофагов мышечной / В.О. Ткачев, О.П. Колесникова, А.В. Троицкий, В.А. Шкурупий // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2008. – Т. 145, № 7. – С. 91-94.
  15. Продукция активных кислородных метаболитов при хронической реакции «трансплантат против хозяина»: связь с Th1/Th2-поляризацией / В.О. Ткачев, Н.Н. Вольский, О.Т. Кудаева, В.О. Козлов // Иммунология. – 2008. – Т. 29, № 4. – С. 209-212.

### Список сокращений

АКМ – активированные кислородные метаболиты

НСТ – нитросиний тетразолий

РТПХ – реакция трансплантат против хозяина

Cat – каталаза

DHEA-S – дегидроэпиадростерон сульфат

IFN- $\gamma$  – интерферон-гамма

LPS – липополисахарид

MDP – мурамилдипептид

NO – оксид азота

OxDex-35 – окисленный декстран с молекулярной массой 35 кДа

OxDex-60 – окисленный декстран с молекулярной массой 60 кДа

SOD – супероксиддисмутаза

Соискатель \_\_\_\_\_ Ткачев В.О.

Подписано к печати 28 сентября 2008г.

Тираж 100 экз. Заказ № 752.

Отпечатано "Документ-Сервис", 630090,  
Новосибирск, Институтская 4/1, тел. 335-66-00