

АКАДЕМИЯ МЕДИЦИНСКИХ НАУК СССР
СИБИРСКОЕ ОТДЕЛЕНИЕ
ИНСТИТУТ КЛИНИЧЕСКОЙ ИММУНОЛОГИИ

На правах рукописи

ВОЛЬСКИЙ Николай Николаевич

УДК 612.017.12+612.429+616.5

ПРОДУКЦИЯ СУПЕРОКСИДНОГО РАДИКАЛА
ФАГОЦИТИРУЮЩИМИ КЛЕТКАМИ СЕЛЕЗЕНКИ И
ЕЕ СВЯЗЬ С ГУМОРАЛЬНЫМ ИММУННЫМ ОТВЕТОМ

14.00.36 – Аллергология и иммунология

А в т о р е ф е р а т
диссертации на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Новосибирск – 1987

Работа выполнена в лаборатории регуляции иммунитета
(зав. - доктор медицинских наук, профессор В.А.Козлов) Институ-
та клинической иммунологии (директор - член-корреспондент АМН
СССР, профессор В.П.Лозовой) СО АМН СССР

Научный руководитель: доктор медицинских наук,
профессор В.А.Козлов

Официальные оппоненты: доктор медицинских наук, профессор
И.С.Фрейдлин, доктор медицинских
наук, профессор Д.Н.Маянский

Ведущая организация: Отдел иммунологии 2-го Московского
Ордена Ленина Государственного медицинского института

Защита состоится " ____ " _____ 1987 г. в ____ часов
на заседании специализированного совета К 001.01.01 (аллерго-
логия и иммунология) при Институте клинической иммунологии СО
АМН СССР (630104, г.Новосибирск, ул. Нарымская, 25).

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Института
клинической иммунологии СО АМН СССР.

Автореферат разослан " ____ " _____ 1987 г.

Ученый секретарь
специализированного совета
кандидат медицинских наук

А.В.Шурлыгина

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы. Изучение регуляции иммунных реакций является одной из центральных проблем иммунологии. Очевидно, что только выяснение основных регуляторных механизмов в иммунной системе дает возможность теоретически понять принципы ее функционирования и использовать их в практических целях. Регуляция функций иммунной системы осуществляется благодаря многообразным и переплетающимся между собой внутрисистемным взаимодействиям иммунокомпетентных клеток, которые тесно связаны с внесистемными — популяционно-генетическими, нейроэндокринными и другими — регуляторными факторами.

Важнейшим звеном внутрисистемной регуляции иммунных процессов является регуляция, осуществляемая фагоцитирующими клетками — макрофагами и гранулярными лейкоцитами, — которые участвуют в развитии и регуляции специфического иммунного ответа практически на всех его этапах. Регуляторные воздействия фагоцитирующих клеток на протекание иммунных процессов обеспечиваются, во-первых, их взаимодействием с антигеном (фагоцитозом, процессированием и презентацией антигенных структур), а во-вторых, выделением большого количества регулирующих факторов, которые влияют на функциональную активность иммунокомпетентных клеток и осуществляют связь и координацию иммунных процессов с функцией других систем организма. Наиболее полно исследовано в настоящее время участие в регуляции иммунного ответа макрофагов (И.Я.Учитель, 1978; И.С.Фрейдлин, 1984; В.А.Козлов, Н.Ю.Громыкина, 1984), но имеющиеся в литературе многочисленные данные убедительно доказывают важную роль гранулоцитов в развитии и регуляции иммунных реакций (А.Н.Маянский, Д.Н.Маянский, 1983; Colvin, Dvorak, 1983).

Способность клеток-фагоцитов продуцировать активные формы кислорода, такие как супероксидный радикал (O_2^-), перекись водорода, синглетный кислород, была обнаружена около 15 лет назад и в настоящее время интенсивно изучается. Установлено, что фагоцитирующие клетки обладают сложными ферментными системами, которые продуцируют O_2^- , обеспечивают возникновение других активных интермедиатов и контролируют их уровень в клетках. Убедительно доказана связь продукции O_2^- с осуществлением клетками-фагоцитами их эффекторных — бактерицидной и цитотоксической — функций (К.И.Суслов, 1984; Nathan, 1982; Babior, 1984). В то же

время связь продукции O_2^- с иммунорегуляторной функцией фагоцитирующих клеток до сих пор практически не изучена. Поэтому установление связи между продукцией O_2^- клетками-фагоцитами и величиной иммунного ответа представляет весьма актуальную проблему, решение которой было бы определенным шагом вперед в понимании роли метаболической активации клеток-фагоцитов в регуляции иммунных процессов.

Цель и задачи исследования. Исходя из вышеизложенного, целью настоящей работы было исследование продукции O_2^- клетками-фагоцитами и ее связи с гуморальным иммунным ответом. Для осуществления данной цели были поставлены следующие задачи:

1) Исследовать продукцию O_2^- клетками селезенки мышей в различные сроки после иммунизации эритроцитами барана (ЭБ) и при различных дозах антигена.

2) Оценить участие в продукции O_2^- неприлипающих клеток селезенки.

3) Изучить влияние на продукцию O_2^- клетками селезенки иммуномодулирующих агентов, включая соединения - индукторы микросомальных монооксигеназ.

4) Выявить наличие (или отсутствие) связи между продукцией O_2^- фагоцитирующими клетками селезенки мышей и величиной гуморального иммунного ответа на ЭБ на фоне введения иммуномодуляторов.

5) Изучить участие O_2^- в регуляции уровня пролиферативного ответа лимфоцитов на митогены.

6) Изучить действие одного из индукторов микросомальных монооксигеназ - лекарственного препарата зиксорина - на продукцию O_2^- клетками-фагоцитами и на иммунные реакции в эксперименте на животных и оценить возможность его применения в клинической практике в качестве иммуномодулирующего средства.

Научная новизна результатов. В данной работе впервые показано - в экспериментах *in vivo* - существование связи между продукцией O_2^- фагоцитирующими клетками селезенки и уровнем антителогенеза в этом органе при иммунизации эритроцитами барана. Обнаружено, что величина антиген-зависимой гиперпродукции O_2^- хорошо коррелирует с величиной гуморального иммунного ответа как у интактных мышей, так и на фоне введения иммуномодуляторов. Кроме того впервые доказано участие O_2^- в процессе митоген-индуцированной пролиферации лимфоцитов человека и мыши, что может быть одним из механизмов, опосредующих связь между продукцией O_2^- в селезенке и гуморальным иммунным ответом. Получены новые данные о

наличии иммуномодулирующих свойств у лекарственного препарата из группы индукторов микросомальных монооксигеназ – зиксорина. Впервые показано стимулирующее влияние гидрокортизона на продукцию O_2^- клетками-фагоцитами.

Теоретическая и практическая значимость работы. Представленные в работе данные говорят о наличии физиологической взаимосвязи между продукцией активных форм кислорода клетками-фагоцитами и интенсивностью процесса антителогенеза. Выводы, вытекающие из этих результатов, могут служить основой для исследования молекулярных механизмов, связывающих метаболическую активность фагоцитирующих клеток с их иммунорегуляторной функцией. Полученные данные говорят также о возможности использования скорости продукции O_2^- в качестве одного из показателей участия клеток-фагоцитов в регуляции иммунных реакций. Практическую ценность имеют данные о наличии иммуномодулирующих свойств у лекарственного препарата "Зиксорин" и о возможности его применения в качестве антиаллергического средства. Это свидетельствует о перспективности использования веществ из группы индукторов микросомальных монооксигеназ как иммуномодуляторов.

Апробация работы. Материалы диссертации доложены и обсуждены на Международном симпозиуме "Клиническое значение препарата Зиксорин", Москва, 1983; на Всесоюзном симпозиуме "Фагоцитоз и иммунитет", Москва, 1983; на конференции молодых ученых Института физиологии СО АМН СССР, Новосибирск, 1985; на Всесоюзной конференции "Профилактика, диагностика и лечение аутоиммунных заболеваний и вторичных иммунодефицитов", Новосибирск, 1985; на межлабораторном семинаре Института клинической иммунологии СО АМН СССР, 1986; на семинаре в лаборатории неспецифического иммунитета Института иммунологии МЗ СССР, Москва, 1987.

Объем и структура диссертации. Диссертация изложена на страницах машинописного текста, содержит 14 таблиц и 25 рисунков. Диссертация состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов, 5 разделов, содержащих результаты собственных исследований и их обсуждение, заключения и выводов. Библиография включает 329 источников, из них 68 на русском языке.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материалы и методы

Экспериментальные исследования проведены на мышах-самцах линий СВА и С57В1, а также на гибридных мышах F_1 (СВА х С57В1). Животных получали из питомника АМН СССР "Столбовая" и использовали в возрасте 2 – 4 месяца. Мыши получали стандартную сбалансированную диету. Во всех опытах исследования проводились одновременно у опытных и контрольных животных.

Скорость продукции O_2^- определяли спектрофотометрическим методом, основанным на восстановлении нитросинего тетразолия (Amano et al., 1975). Результаты выражали в условных единицах, принимая за единицу активности увеличение оптической плотности при 570 нм на 0,001 OD за 45 минут. Процесс фагоцитоза инициировали добавлением частиц латекса в среду инкубации. Поскольку скорость продукции O_2^- НАД(Ф)Н-оксидазой клеток-фагоцитов зависит как от активности самого фермента, так и от уровня восстановленных пиридиннуклеотидов в клетках, была исследована также скорость этой реакции в условиях избытка донора электронов. Для этого в некоторых опытах в среду инкубации добавляли различные концентрации НАД H_2 . Величины V_{max} и K_M для НАД H_2 определяли при этом графически, используя метод двойных обратных величин (Диксон, Уэбб, 1966).

Величину гуморального иммунного ответа оценивали по количеству антителообразующих клеток (АОК) в селезенке на четвертые сутки после иммунизации ЭБ в дозе 2×10^8 клеток (Cunningham, 1968). Выраженность реакции гиперчувствительности замедленного типа (ГЗТ) оценивали, измеряя толщину лапки у мышей через 24 часа после введения разрешающей дозы ЭБ (Yoshikai et al., 1979). Клиренс коллоидного угля определяли по методу И.Я.Учитель (1978), графически определяя при этом время полувыведения и величину фагоцитарного индекса. Удаление прилипающих клеток проводили с помощью двукратного прилипания к пластику, инкубируя спленоциты на чашках Петри в течение 1 часа при $37^{\circ}C$. Содержание фагоцитирующих клеток в селезенке оценивали после в/в введения мышам частиц коллоидного угля или латекса, подсчитывая в мазках, приготовленных из суспензии спленоцитов, относительное количество клеток, содержащих фагоцитированные частицы (И.Я.Учитель, 1978). Интенсивность пролиферации лимфоцитов оценивали по включению 3H -тими-

дина в ДНК клеток, культивируя лимфоциты в течение 72 часов в воздухе, содержащем 5% CO₂, и стимулируя пролиферативный ответ оптимальной (10 мкг/мл) дозой конканавалина А. При этом мононуклеарные клетки из периферической крови здоровых доноров культивировали в среде I99, содержащей 20% сыворотки крови человека IV группы, а спленоциты мыши – в среде RPMI 1640 с добавлением NERES (20 мМ, рН 7,4), телячьей эмбриональной сыворотки (10%), гентамицина (50 мкг/мл), L-глутамин (2 мМ) и 2-меркаптоэтанола (30 мкМ).

Гидрокортизон ацетат, 3,4-бензпирен, 3-метилхолантрен и левамизол вводили мышам в/бр в дозах 50, 100, 50 и 25 мг/кг веса, соответственно. Зиксорин вводили перорально в течение 3 дней в дозе 200 мг/кг веса/сутки. Обработанные фенилгидразином эритроциты получали из крови мышей, которым за сутки до забоя вводили в/бр трехкратно по 1 мг фенилгидразина гидрохлорида, такие "фенилгидразиновые" эритроциты вводили сингенным мышам в/в в дозе 0,2 мл эритроцитарной взвеси на мышь. Продигозан вводили мышам в/бр в дозе 10 мкг/мышь. Исследования продукции O₂ или иммунизацию животных проводили через 1 сутки после введения иммуномодуляторов.

Клинические испытания препарата "Зиксорин" в качестве антиаллергического средства были проведены по поручению Фармакологического комитета Управления по внедрению новых лекарственных средств и медицинской техники Минздрава СССР. Было проведено лечение зиксоринем 44 больных аллергическими дерматозами, из них 30 страдали хронической рецидивирующей крапивницей и 14 больных – атопическим дерматитом. Каждый больной после предварительного клинического и лабораторного обследования получал по 200 мг зиксорина 3 раза в день в течение 5 дней. Во время лечения зиксоринем больные не получали никаких других лекарств. Через 1 – 2 дня после последнего приема лекарства больным проводилось повторное обследование.

Клинический НСТ-тест проводили по модифицированному методу Park (Э.М. Тананко и др., 1981). Количество общего иммуноглобулина Е в сыворотке крови больных определяли с помощью стандартных наборов "Phadebas IgE PRIST" радиоиммунным методом. Относительное содержание лимфоцитов и эозинофильных лейкоцитов определяли в мазках крови, окрашенных по Романовскому-Гимзе. Содержание Т-лимфоцитов в крови оценивали методом розеткообразования с эритроцитами барана (Galily et al., 1975), а содержание В-лимфоцитов – методом розеткообразования с эритроцитами быка (Mendes et al., 1973).

Статистическую оценку значимости различий исследуемых показателей осуществляли с помощью непараметрических критериев Манна-Уитни и знако-рангового критерия Уилкоксона, величину связи между показателями и ее значимость оценивали с помощью коэффициента линейной корреляции и критерия точной вероятности Фишера (Рунион, 1982; Ферстер, 1983).

Результаты и обсуждение

Производство O_2^- фагоцитирующими клетками селезенки мышей и ее изменения при иммунизации животных. Средняя скорость продукции O_2^- спленоцитами мышей-самцов линии СВА составляет $4,2 \pm 0,3$ ед./ 10^6 клеток и на 60% ингибируется добавлением супероксиддисмутазы, что хорошо совпадает с литературными данными (Ваehner et al., 1975). Добавление к суспензии клеток фагоцитируемых частиц латекса стимулировало продукцию O_2^- в 2 - 3 раза. Инкубация клеток в присутствии высоких концентраций экзогенного донора электронов (НАД· H_2) позволила оценить максимальную скорость продукции O_2^- , которая у мышей линии СВА равнялась $35,8 \pm 1,7$ ед./ 10^6 клеток.

Удаление прилипающих клеток из суспензии спленоцитов с помощью двукратного прилипания к пластику сопровождалось резким (более, чем на 90%) снижением скорости продукции O_2^- спленоцитами (в исходной суспензии спленоцитов скорость продукции O_2^- равнялась в этой серии опытов $7,2 \pm 0,9$ ед./ 10^6 клеток, а в популяции неприлипших клеток - $0,6 \pm 0,1$ ед./ 10^6 клеток). Отсюда видно, что в неразделенной суспензии клеток селезенки продукция O_2^- осуществляется в основном клетками-фагоцитами и что ее определение может служить хорошей оценкой интенсивности кислородного метаболизма фагоцитирующих клеток селезенки мышей. Этот вывод подтверждается трехкратным увеличением продукции O_2^- клетками селезенки при фагоцитозе частиц латекса и хорошо согласуется с литературными данными о том, что лимфоциты, в том числе лимфоциты из селезенки мышей, практически не продуцируют O_2^- (М.И.Карсонова, Б.В.Пинегин, 1985; Badwey et al., 1983).

Иммунизация животных сопровождалась достоверным увеличением продукции O_2^- через 6 часов после в/в введения антигена (ЭБ). Увеличение продукции O_2^- после введения 2×10^8 ЭБ составляло у мышей линии СВА в среднем $87 \pm 18\%$ от исходного уровня продукции

O_2^- (у мышей-гибридов F_1 скорость продукции O_2^- увеличивалась в среднем на 48%). В серии опытов было исследовано влияние дозы антигена на увеличение продукции O_2^- фагоцитирующими клетками селезенки. Полученные данные показывают (Рис. 1), что параллельно

Продукция O_2^- ,
% от контроля

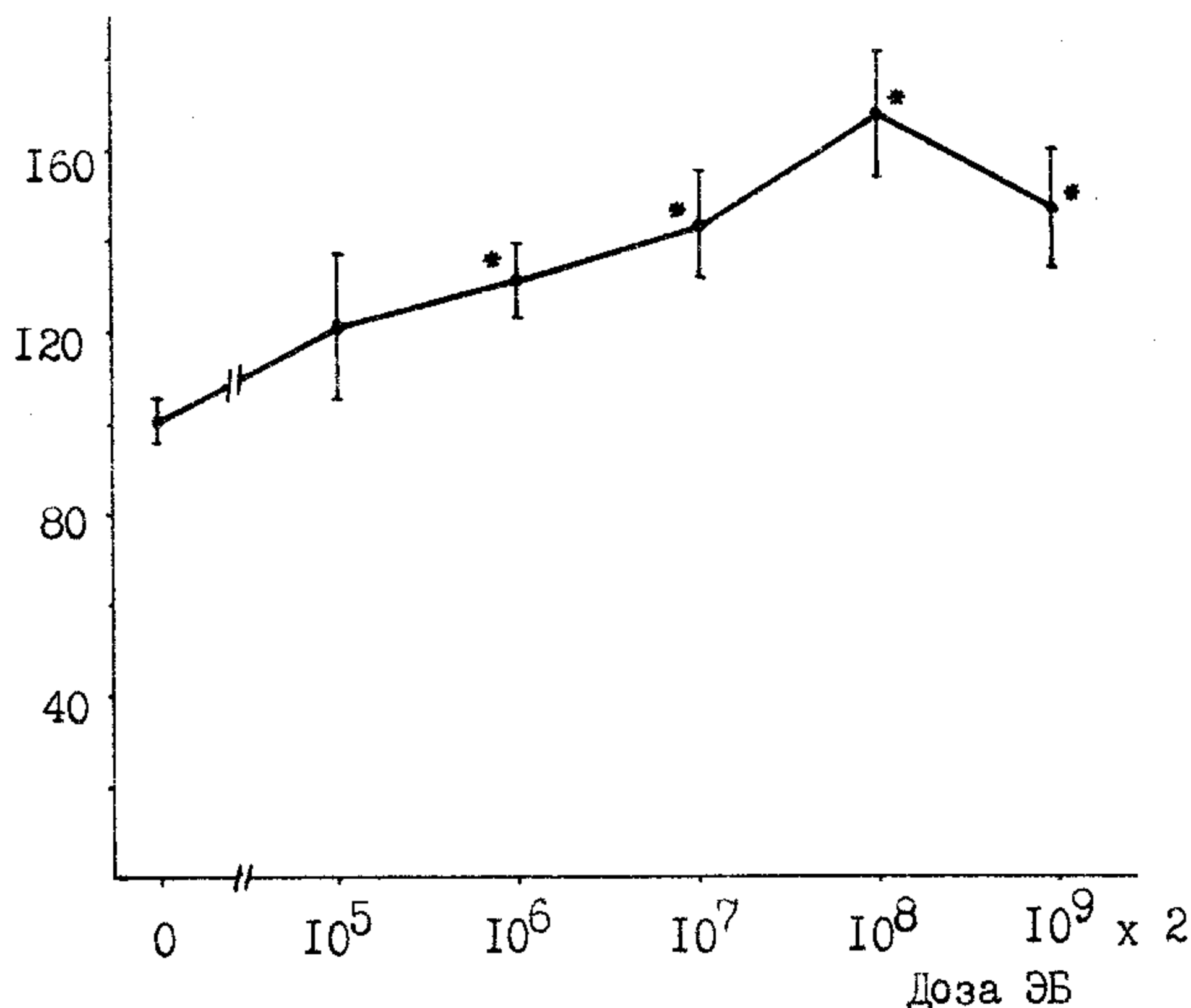


Рис. 1. Влияние дозы антигена на скорость продукции O_2^- фагоцитирующими клетками селезенки мышей линии СВА через 6 часов после в/в введения ЭБ.
* достоверное отличие от контроля ($P < 0,01$)

увеличению дозы ЭБ от 2×10^5 до 2×10^8 увеличивается и прирост продукции O_2^- по сравнению с неиммунизированными животными. Дальнейшее увеличение дозы ЭБ не сопровождалось повышением продукции O_2^- , а даже имелась тенденция к некоторому снижению этого показателя. Максимальная продукция O_2^- (измеренная в присутствии 500 мкМ НАД·Н₂) также достоверно увеличивалась после иммунизации большими дозами антигена, но увеличение этого показателя было менее выражено и четкой зависимости от дозы антигена не обнаруживалось.

Определение содержания в селезенке клеток, фагоцитирующих

частицы коллоидного угля и латекса, показало, что количество таких клеток через 6 часов после введения ЭБ не отличается от их количества в селезенке неиммунизированных мышей, и что, следовательно, наблюдаемое в этот срок повышение продукции O_2^- не может быть объяснено увеличением количества фагоцитирующих клеток в селезенке.

Полученные данные свидетельствуют о функциональной активации клеток-фагоцитов селезенки через несколько часов после их контакта с антигеном, что проявляется в увеличении продукции O_2^- этими клетками и, вероятно, связано с их участием в регуляции процессов иммуногенеза.

Влияние иммуномодуляторов на продукцию O_2^- . Поскольку действие иммуномодулирующих агентов на иммунный ответ во многих случаях зависит от их влияния на функциональную активность фагоцитирующих клеток, было предположено, что такое влияние может проявляться в изменении продукции O_2^- этими клетками. Для проверки этого предположения была изучена продукция O_2^- в селезенке после введения животным 7 различных веществ, стимулирующих или супрессирующих гуморальный иммунный ответ.

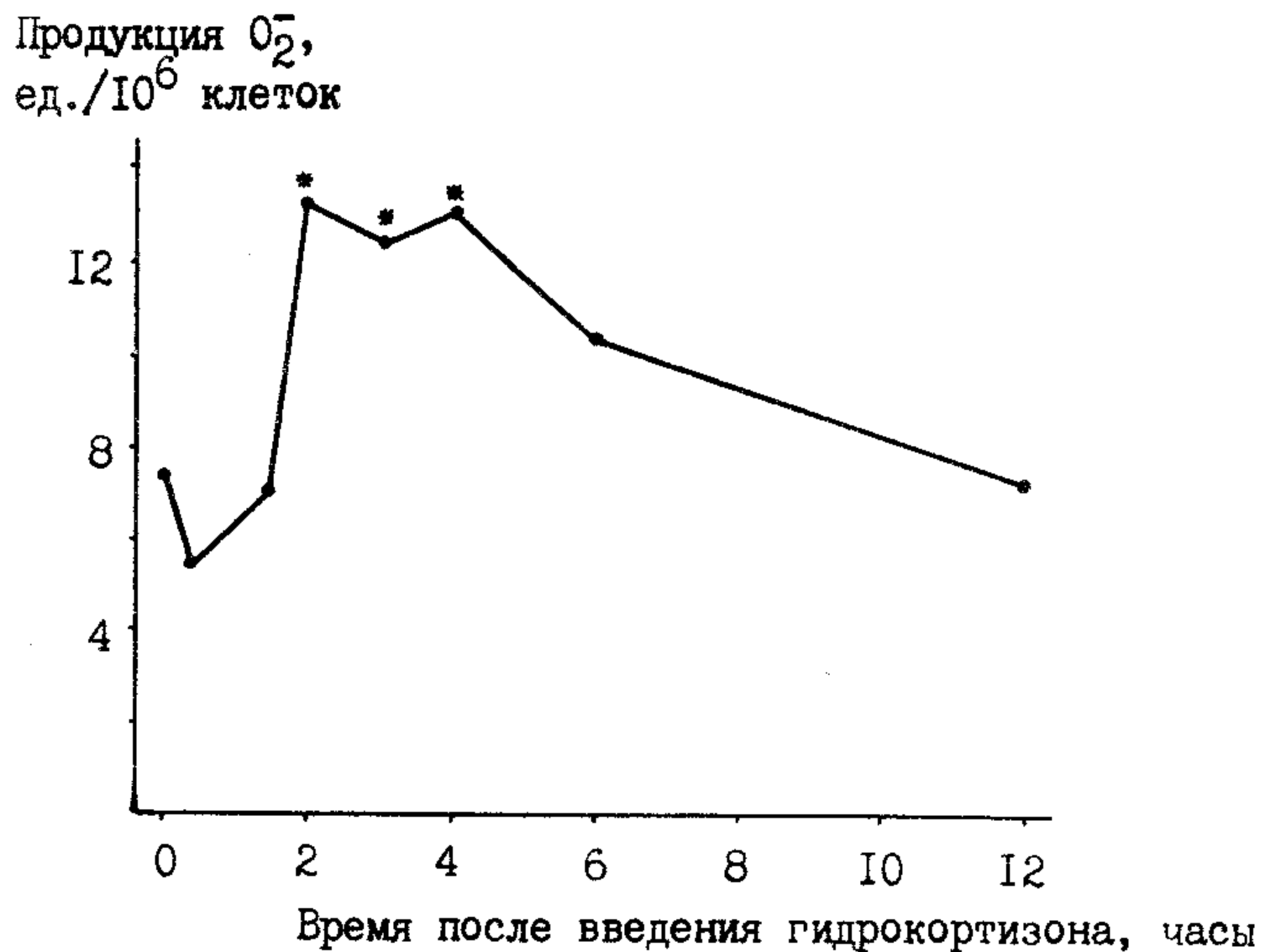


Рис. 2. Действие гидрокортизона на стимулированную латексом продукцию O_2^- клетками-фагоцитами селезенки мышей линии СВА.

*достоверное отличие от контроля ($P < 0,01$)

Наиболее подробно было изучено влияние на этот процесс глюкокортикоидного гормона гидрокортизона. Было установлено, что введение гидрокортизона мышам вызывает через 2 часа увеличение стимулированной латексом продукции O_2^- в 1,8 раза по сравнению с контролем (Рис. 2). При добавлении к суспензии спленоцитов различных концентраций гормона *in vitro* показано, что величина V_{max} НАД(Ф)Н-оксидазы фагоцитов линейно увеличивается в зависимости от концентрации гидрокортизона в инкубационной среде (Рис. 3).

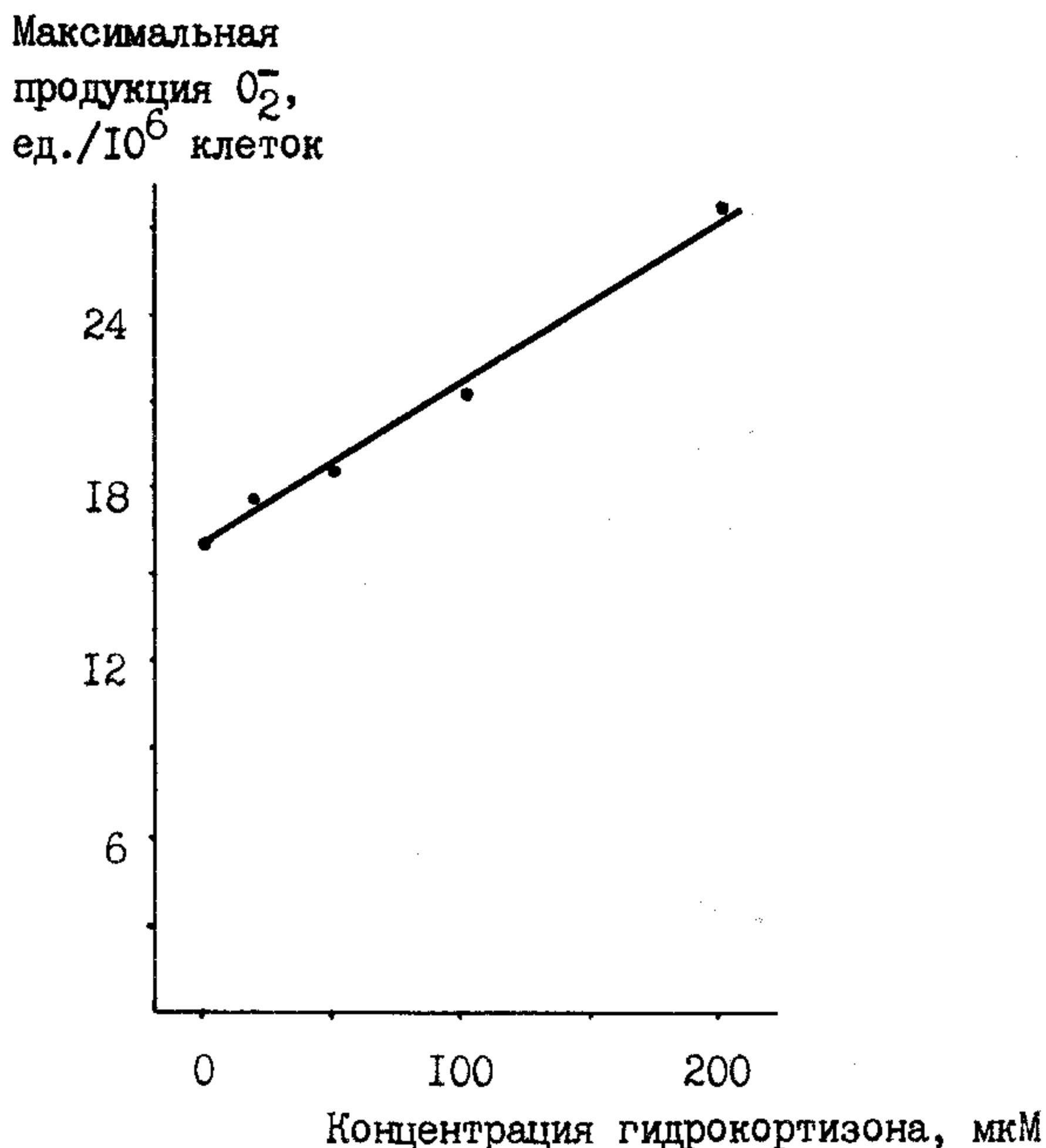


Рис. 3. Влияние гидрокортизона *in vitro* на максимальную скорость продукции O_2^- фагоцитирующими клетками селезенки мышей линии СВА.

Поскольку активация фермента наблюдалась уже в течение нескольких минут после добавления гормона и поскольку этот процесс не ингибировался актиномицином Д, сделан вывод о том, что эффект гидрокортизона опосредован его прямым действием на мембраны клеток-фагоцитов. Подобное непосредственное действие глюкокортикоидов на клеточные мембраны многократно описано в литературе (П. В. Сергеев

и др., 1971).

Два других, исследованных в данной работе, иммуномодулирующих агента — продигозан и "фенилгидразиновые" эритроциты — увеличивали продукцию O_2^- фагоцитирующими клетками селезенки мышей через сутки после введения их животным. Это совпадает с литературными данными о том, что эти агенты изменяют функциональную активность фагоцитов (В.А.Козлов и др., 1982; Д.Н.Лазарева, Е.К.Алехин, 1985).

Из четырех исследованных веществ, принадлежащих к классу индукторов микросомальных монооксигеназ, три соединения — метилхолантрен, бензпирен и зиксорин — достоверно изменяли продукцию O_2^- клетками-фагоцитами селезенки. При этом ароматические углеводороды увеличивали, а зиксорин снижал скорость этого процесса. Влияния левамизола на скорость продукции O_2^- не обнаружено.

Таким образом, было установлено, что почти все исследованные вещества изменяют скорость продукции O_2^- в селезенке мышей, и это свидетельствует в пользу существования достаточно тесной взаимосвязи между иммуномодулирующей активностью изученных соединений и их влиянием на метаболическую активность фагоцитов. В то же время полученные в этих экспериментах результаты не позволяют сделать какой-либо конкретный вывод о характере зависимости между метаболической и иммунорегуляторной активностью фагоцитирующих клеток селезенки, так как некоторые из исследованных веществ с супрессирующим влиянием на гуморальный иммунный ответ (гидрокортизон, фенилгидразин) стимулировали продукцию O_2^- в селезенке, а другие (бензпирен, метилхолантрен), также являющиеся иммунодепрессантами, — подавляли скорость этого процесса.

Связь между продукцией O_2^- в селезенке мышей и гуморальным иммунным ответом. Исходя из вышеизложенных результатов, было предположено, что метаболическим показателем, отражающим регуляторную роль клеток-фагоцитов в формировании иммунного ответа, может быть не исходная (до иммунизации) скорость продукции O_2^- , а ее изменения в ответ на иммунизацию. Для проверки этого предположения была проведена серия экспериментов, в которой изучены изменения продукции O_2^- после антигенного воздействия на фоне введения иммуномодуляторов, при этом параллельно измерялась величина иммунного ответа на ЭБ.

Почти все использованные иммуномодулирующие агенты (за исключением левамизола) достоверно изменяли уровень гуморального иммунного ответа. Направленность действия исследованных веществ

на величину иммунного ответа совпадала при этом с их эффектами, описанными в литературе. Иммуностимулирующее действие зиксорина на гуморальный иммунный ответ описано нами впервые (Н.Н.Вольский и др., 1985).

Было установлено, что прирост продукции O_2^- в ответ на введение антигена (то есть скорость продукции O_2^- через 6 часов после введения ЭБ минус скорость продукции O_2^- до иммунизации) – параметр, обозначенный как "антиген-зависимая гиперпродукция O_2^- " (АЗГ) – изменяется у мышей после введения иммуномодуляторов, причем направленность изменений величины АЗГ хорошо совпадает с направленностью действия иммуномодуляторов на величину иммунного ответа (Рис. 4).

Величина иммунного
ответа и величина АЗГ,
усл. ед.

□ иммунный ответ
▨ АЗГ

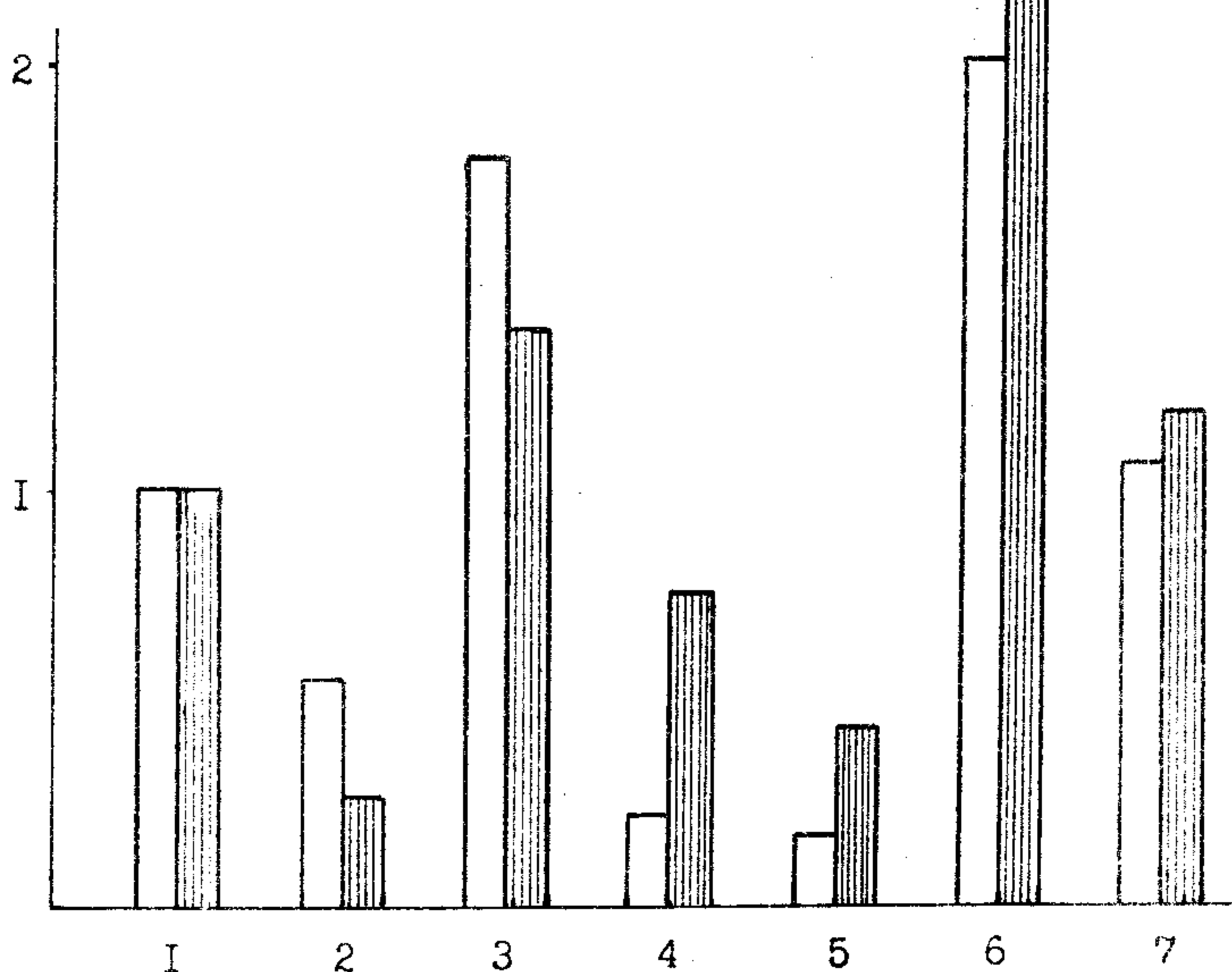


Рис. 4. Действие иммуномодуляторов на величину иммунного ответа на ЭБ и на величину АЗГ.
I – контроль, 2 – "фенилгидразиновые" эритроциты, 3 – продигозан, 4 – бензпирен, 5 – метилхолантрен, 6 – зиксорин, 7 – левамизол.

Пользуясь критерием точной вероятности Фишера, было установлено, что совпадение между действием иммуномодуляторов на величину АЗГ в селезенке и величину иммунного ответа не случайно и что эти эффекты связаны достоверной ($P < 0,025$) связью. Вычисление коэффициента линейной корреляции показало (Рис. 5), что между величиной АЗГ и количеством АОК в селезенке мышей линии СВА существует достоверная положительная корреляция ($r = +0,61$).

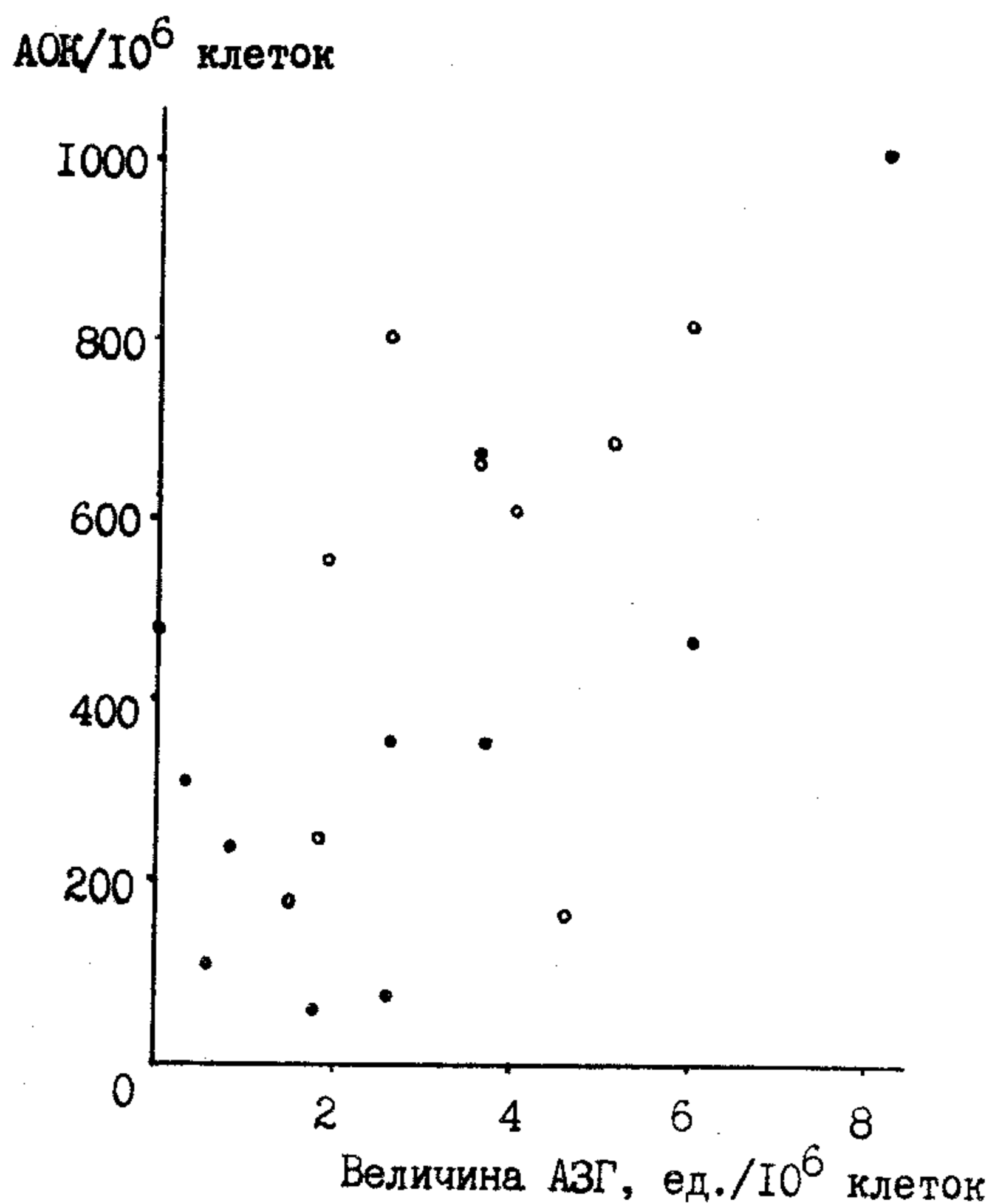


Рис. 5. Корреляция между величиной гуморального иммунного ответа на ЭБ и величиной антиген-зависимой гиперпродукции O_2^- у мышей линии СВА.
 ○ — интактные мыши
 ● — мыши, получавшие иммуномодуляторы

Таким образом, результаты экспериментов *in vivo* доказывают, что наблюдающаяся в ранние сроки после введения антигена стимуляция продукции O_2^- клетками-фагоцитами селезенки отражает интенсивность процессов иммуногенеза в этом органе, а воздействия, которые увеличивают или уменьшают величину такой стимуляции —

величину АЗГ – сопровождаются соответствующими изменениями величины гуморального иммунного ответа. Это говорит о существовании в физиологических условиях функциональной связи между метаболической активностью фагоцитирующих клеток селезенки – одним из показателей которой может служить продукция O_2^- – и уровнем иммунного ответа. Клеточные и биохимические механизмы, связывающие продукцию O_2^- с процессом антителогенеза, неизвестны, но одним из возможных объяснений наблюдаемой связи может быть непосредственное участие O_2^- (или его метаболитов) в регуляторных воздействиях, оказываемых клетками-фагоцитами на иммунный ответ.

Участие O_2^- в митоген-стимулированной пролиферации лимфоцитов. Было предположено, что этапом иммуногенеза, который регулируется с участием O_2^- , может быть процесс пролиферации лимфоцитов. Поскольку известно, что многие митогены – в том числе и конканавалин А – стимулируют продукцию O_2^- фагоцитами (Korehak et al., 1983), было изучено влияние супероксиддисмутазы (СОД) на пролиферацию лимфоцитов человека и мыши, стимулированную Кон А.

Установлено, что внесение в культуру клеток СОД в дозе 100 мкг/мл достоверно ($P < 0,001$) ингибирует пролиферативный ответ на Кон А мононуклеарных клеток из периферической крови здоровых доноров в среднем на 43%. В то же время добавление к культуре клеток фермента, инактивированного нагреванием, не оказывало влияния на пролиферацию лимфоцитов.

Ингибирование митоген-стимулированной пролиферации было обнаружено также при добавлении СОД к культурам спленоцитов мышей линии С57В1*. Подтверждением того, что эффект СОД в этой системе связан с удалением O_2^- из среды инкубации, являются и результаты опытов с $Cu(Lys)_2$ – хелатом меди с супероксиддисмутазной активностью, – обнаружившие дозозависимый эффект этого соединения на процесс пролиферации лимфоцитов мыши (Рис. 6). Ни СОД, ни $Cu(Lys)_2$ не влияли в этих опытах на жизнеспособность культивируемых клеток.

Ранее было известно, что выделяемая макрофагами перекись водорода обуславливает (совместно с простагландинами) супрессирующее влияние этих клеток на пролиферацию лимфоцитов (Metzger et al., 1980; Whisler et al., 1982). Описанные выше результаты

*Опыты проведены совместно с Н.В.Кашлаковой

позволяют предполагать, что выделяемые макрофагами активные формы кислорода опосредуют не только ингибирующее, но и стимулирующее влияние макрофагов на пролиферацию лимфоидных клеток.

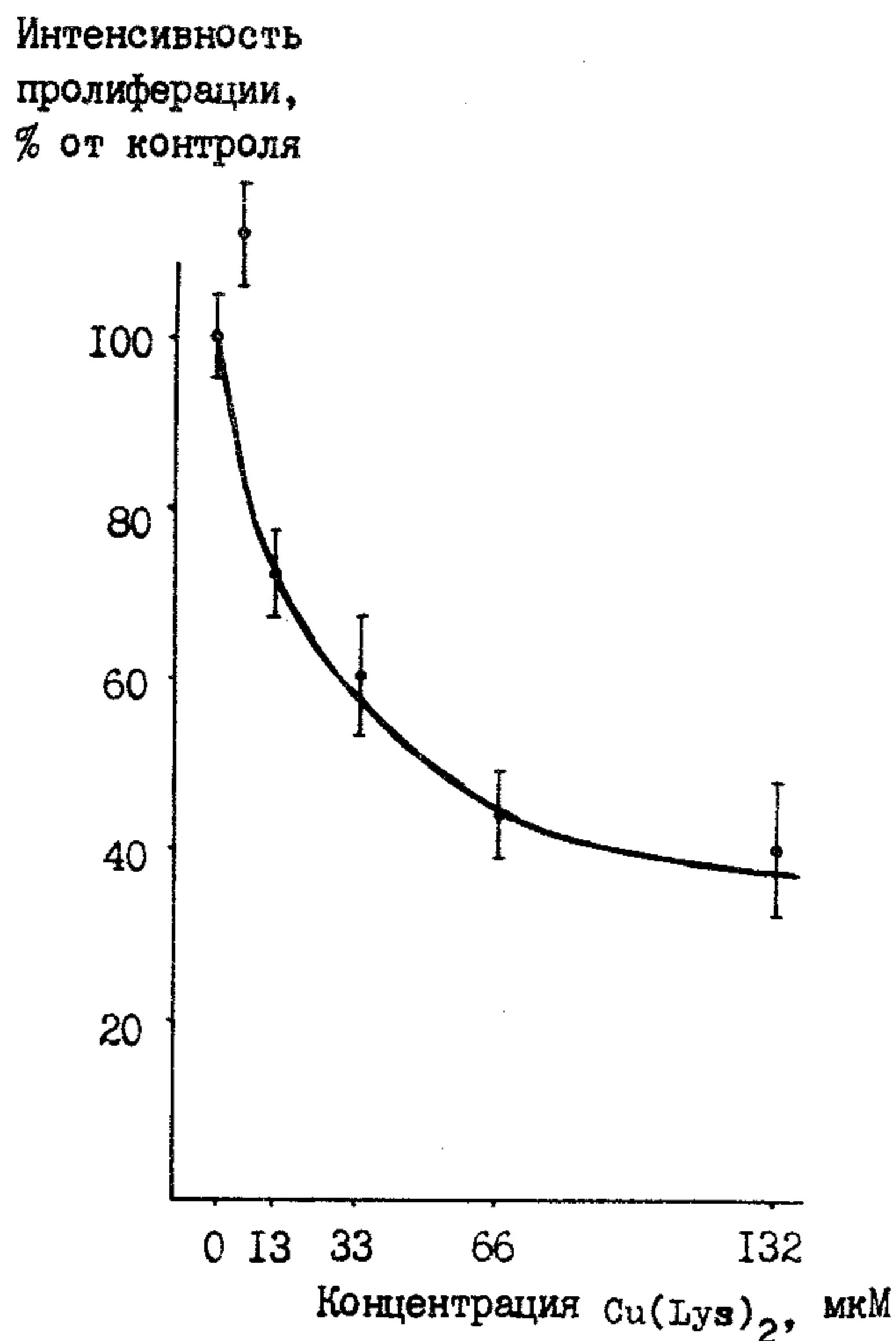


Рис. 6. Влияние различных концентраций $\text{Cu}(\text{Lys})_2$ на уровень стимулированной Кон А пролиферации спленоцитов мышей линии С57В1.

Таким образом, участие O_2^- и его метаболитов в регуляции процесса пролиферации лимфоцитов может быть одним из механизмов, объясняющих наличие связи между продукцией O_2^- в селезенке и величиной гуморального иммунного ответа.

Исследование иммуномодулирующих свойств препарата "Зиксорин" и его применение в качестве антиаллергического средства.
В ранее описанных опытах с иммуномодуляторами было установлено,

что зиксорин изменяет скорость продукции O_2^- фагоцитирующими клетками селезенки и стимулирует гуморальный иммунный ответ на ЭБ. Исходя из этих данных и учитывая клиническое использование зиксорина, было более подробно изучено его влияние на иммунные реакции.

Из Рис. 7 видно, что зиксорин оказывает ингибирующее действие на реакцию гиперчувствительности замедленного типа (ГЗТ).

Разность в
толщине лапок, мм

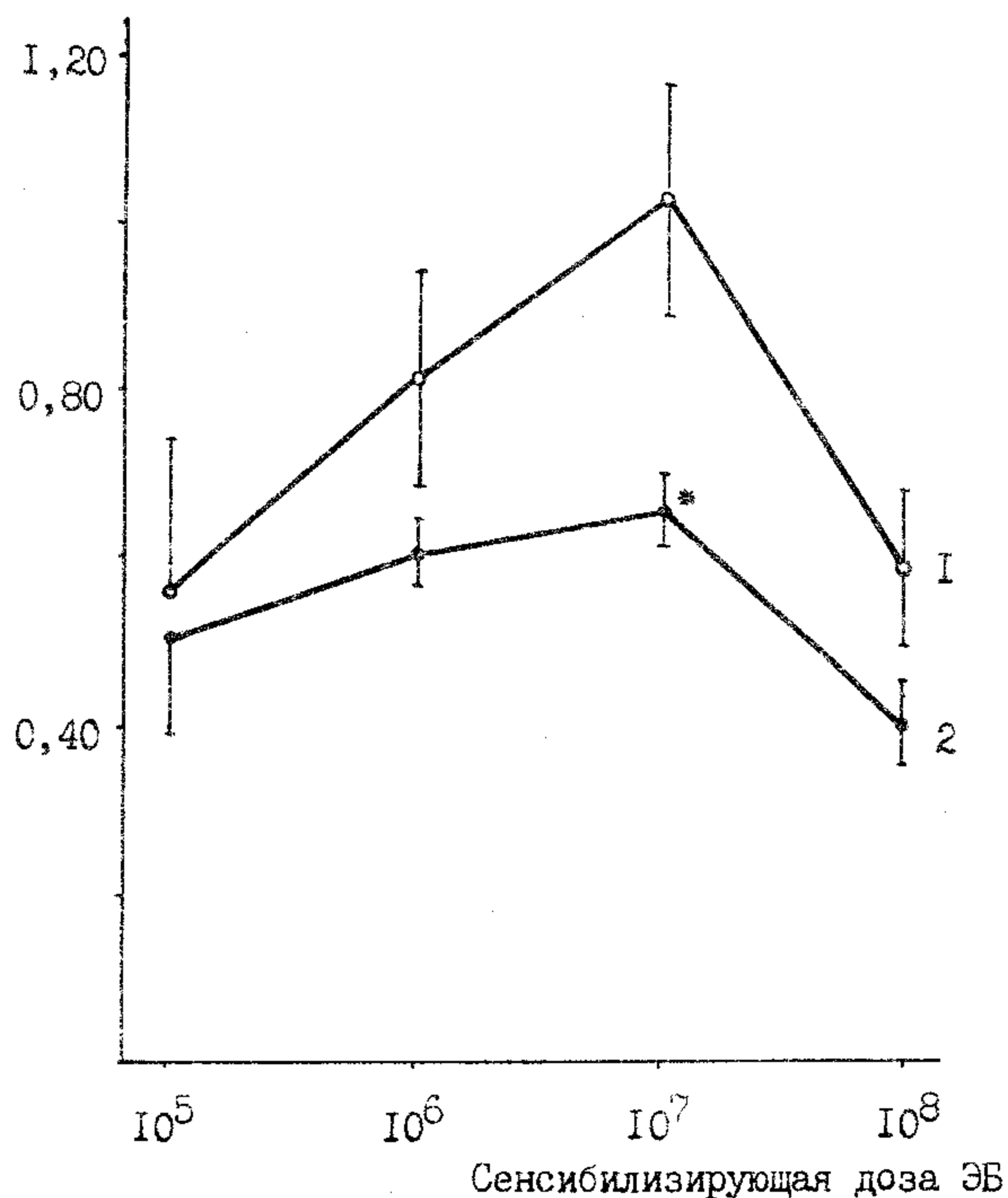


Рис. 7. Влияние трехкратного введения зиксорина в дозе 200 мг/кг веса на реакцию ГЗТ у мышей F_1 .
I - контроль, 2 - после введения зиксорина
*достоверное отличие от контроля ($P < 0,05$)

Следовательно, стимулируя гуморальный иммунный ответ на ЭБ, зиксорин одновременно подавляет реакцию ГЗТ на этот же антиген. Подобное разнонаправленное действие на величины гуморального и клеточного иммунного ответа показано для некоторых иммуномодуляторов, которые влияют на функциональную активность клеток-фагоцитов (Megal et al., 1974; Baird et al., 1975).

Было обнаружено, что зиксорин увеличивает клиренс туши у мышей (величина фагоцитарного индекса достоверно повышалась с $0,065 \pm 0,005$ до $0,115 \pm 0,012$ после трехкратного введения зиксорина в дозе 120 мг/кг веса). Исходя из этих данных и принимая во внимание повышение величины АЗГ под влиянием зиксорина (Рис. 4), можно считать, что эффект этого лекарства на иммунные реакции опосредуется его влиянием на фагоцитирующие клетки.

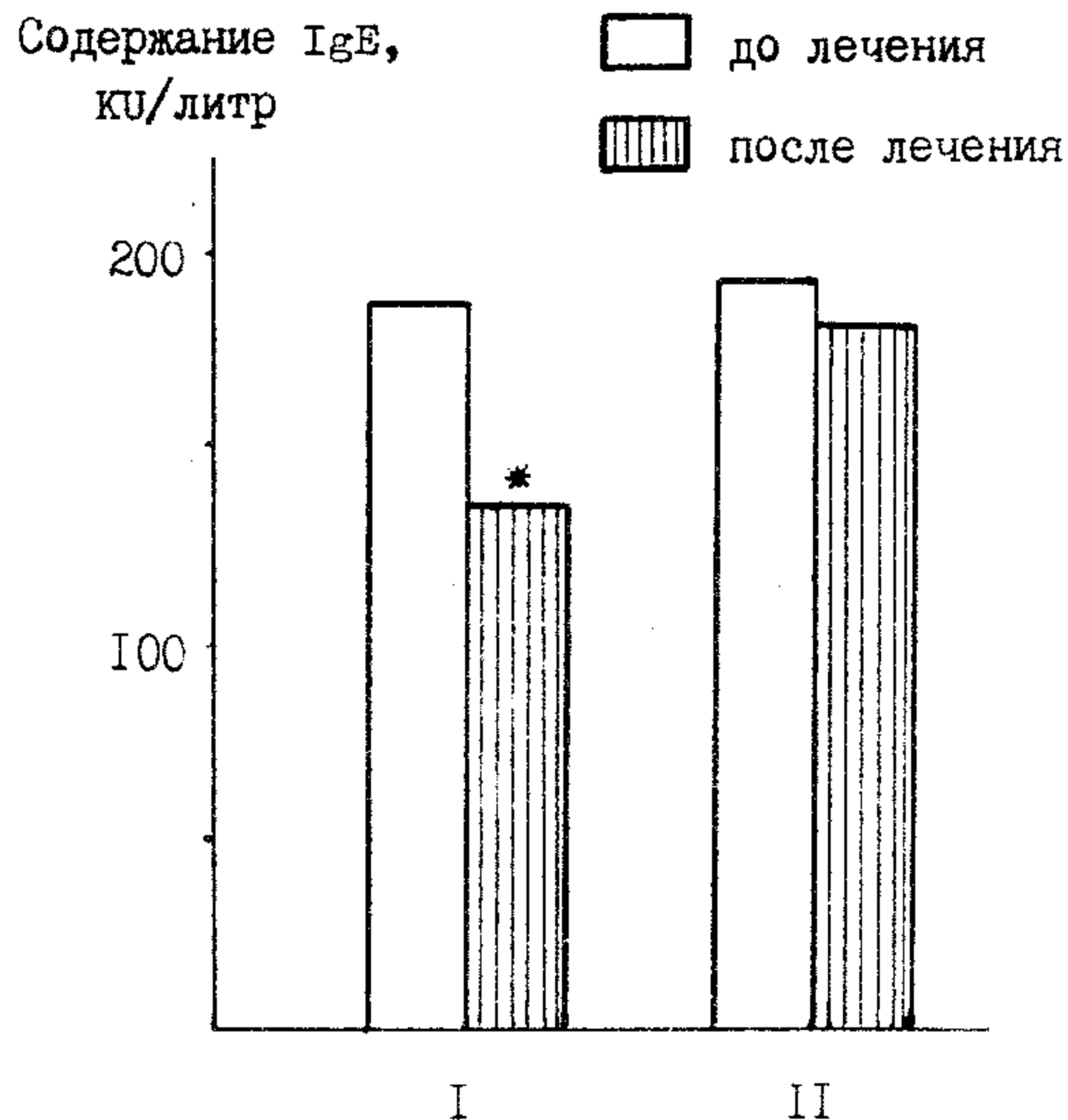


Рис. 8. Содержание IgE в сыворотке крови у больных аллергическими дерматозами до и после лечения зиксоринном.

I – группа больных, у которых зарегистрировано клиническое улучшение;

II – группа больных с отсутствием клинического эффекта

*достоверное отличие ($P < 0,01$)

Клинические испытания зиксорина* показали, что он обладает лечебным эффектом у больных аллергическими дерматозами. Пятидневный курс лечения зиксоринном приводил к улучшению клинического состояния у 61% обследованных больных. Это сопровождалось нормализацией лабораторных показателей после курса лечения: у больных снижался средний уровень НСТ-теста (с $26,8 \pm 5,6\%$ до $12,4 \pm 3,4\%$) и уменьшалось содержание IgE в сыворотке крови (с 192 ± 43 КУ/литр до 154 ± 35 КУ/литр). При этом понижение уровня IgE хорошо совпадало с клиническим эффектом лечения: достоверное снижение уровня IgE было обнаружено лишь в группе больных с улучшением клинического состояния и практически не наблюдалось в группе больных, у которых лечение зиксоринном не дало благоприятного эффекта (Рис. 8). Содержание Т- и В-лимфоцитов в крови больных после лечения зиксоринном не изменялось.

Таким образом, полученные в данной работе результаты свидетельствуют о существовании физиологической взаимосвязи между изменениями продукции O_2^- фагоцитирующими клетками селезенки мышей при иммунизации и интенсивностью иммуногенеза в этом органе. Это дает возможность нового подхода в изучении молекулярных механизмов регуляторной роли фагоцитов в развитии иммунных реакций.

ВЫВОДЫ

1. Между продукцией O_2^- в селезенке мышей и интенсивностью гуморального иммунного ответа существует функциональная взаимосвязь, о чем свидетельствуют зависимое от дозы антигена увеличение скорости продукции O_2^- в селезенке через 6 часов после иммунизации эритроцитами барана и наличие положительной корреляции между величиной антиген-зависимой гиперпродукции O_2^- и количеством антителообразующих клеток в селезенке иммунизированных животных.

2. Одним из эффектов действия ряда иммуномодулирующих агентов являются изменения продукции O_2^- в селезенке мышей, причем повышение величины антиген-зависимой гиперпродукции O_2^- под влиянием иммуномодуляторов сопровождается стимуляцией гумораль-

*В проведении клинических испытаний участвовали В.М.Непомнящих, Т.А.Носикова, Л.Б.Дымшиц, И.И.Лубянская, И.Н.Нагорная.

ного иммунного ответа на эритроциты барана, а ее снижение – супрессией иммунного ответа.

3. Активация кислородного метаболизма клеток-фагоцитов может быть одним из механизмов влияния глюкокортикоидных гормонов на иммунный ответ, так как установлено, что одним из самых ранних эффектов гидрокортизона является стимуляция продукции O_2^- в селезенке мышей, благодаря увеличению активности НАД(Ф)Н-оксидазы.

4. Супероксидный радикал участвует в регуляции процесса пролиферации лимфоцитов, поскольку снижение его концентрации в среде культивирования с помощью супероксиддисмутазы или $Cu(Lys)_2$ – хелата меди с супероксиддисмутазной активностью – ингибирует пролиферацию лимфоцитов человека и мыши, стимулированную конканавалином А.

5. Лекарственный препарат из группы индукторов микросомальных монооксигеназ "Зиксорин" является иммуномодулирующим средством, так как он стимулирует у мышей гуморальный иммунный ответ на эритроциты барана, одновременно подавляя реакцию гиперчувствительности замедленного типа на этот же антиген. Иммуномодулирующий эффект зиксорина опосредуется его действием на клетки-фагоциты, причем одним из эффектов такого воздействия является изменение продукции O_2^- фагоцитирующими клетками.

6. Секреция O_2^- и его метаболитов клетками-фагоцитами является, наряду с секрецией фагоцитами других веществ, одним из параметров, отражающих регуляторные влияния этих клеток на иммунные реакции.

Список работ, опубликованных по теме диссертации

1. Громыкина Н.Ю., Орловская И.А., Вольский Н.Н., Чугунов А.Н., Цырлова И.Г. Макрофагальная зависимость иммуномодулирующего эффекта гормонов и ксенобиотиков // Фагоцитоз и иммунитет. Тез. докл. Всесоюз. симпозиума. – М. – 1983. – С. 77.
2. Вольский Н.Н., Цырлова И.Г., Козлов В.А. Селективное действие зиксорина, индуктора цитохрома Р-450, на гуморальный иммунный ответ и реакцию гиперчувствительности замедленного типа // Иммунология. – 1985. – № 3. – С. 47 – 49.
3. Тананко Э.М., Непомнящих В.М., Вольский Н.Н. Возможность применения НСТ-теста, как метода оценки эффективности лечения у больных аллергическими заболеваниями // Профилактика,

- диагностика и лечение аутоиммунных заболеваний и вторичных иммунодефицитов. Тез. докл. Всесоюз. конференции. - Новосибирск - 1985. - С. 103 - 104.
4. Вольский Н.Н. Стимуляция гидрокортизоном метаболической активности макрофагов *in vivo* и *in vitro* // Нейро-гуморальная регуляция иммунного гомеостаза. Тез. докл. Всесоюз. симпозиума. - Л. - 1986. - С. 33 - 34.
 5. Вольский Н.Н., Козлов В.А. Стимулирующее влияние полициклических ароматических углеводов на продукцию супероксидного радикала фагоцитирующими клетками селезенки // Проблемы создания и совершенствования автоматизированных систем охраны труда, окружающей среды и здоровья населения промышленных городов. Тез. докл. Всесоюз. конференции. - Ангарск - 1986. - С. 167 - 168.
 6. Лозовой В.П., Вольский Н.Н., Непомнящих В.М., Тананко Э.М., Носикова Т.А. Влияние индуктора микросомальных монооксигеназ зиксорина на клинико-иммунологические показатели у аллергологических больных // Тер. архив. - 1987. - Т. 59, № 2. - С. 7 - 9.

Ваш

Подписано к печати 10.04.87 г.
МН 13494. Печ. л. 1,0. Тираж 100 экз.
Отпечатано ротاپринтом СО АМН СССР
Заказ № 327.