

**IN VITRO ЭФФЕКТЫ ИММУНОСТИМУЛИРУЮЩЕГО  
БАКТЕРИАЛЬНОГО ЛИЗАТА НА ФУНКЦИЮ ЛИМФОЦИТОВ КРЫС.  
ОТДЕЛЕНИЕ ПОЛИМОРФНОЯДЕРНЫХ ЛИМФОЦИТОВ И  
СТИМУЛЯЦИЯ MLVL**

**Евтушенко М. С., Кошева Е. Ю.<sup>1</sup>, Крыжная С. И.**

*Харьковская медицинская академия последипломного образования,*

*г. Харьков, Украина*

<sup>1</sup>*Национальный фармацевтический университет, г. Харьков, Украина*

*kryghna@gmail.com*

Периферическая кровь была получена от здоровых крыс самцов. Полиморфноядерные лимфоциты (ПМЯЛ) выделяли путем центрифугирования в градиенте фикоколгипаке.

**Материалы и методы.** 1 мл крови разбавляли ЗФР 1:1 и 2 мл из шприца через тонкую иглу наносили на поверхность фикокол-верографина, выдерживали 15-20 мин при комнатной температуре, а затем центрифугировали при 4°C 15 мин при 1000 g.

Тонкой инъекционной иглой с заточенным концом 1 мл шприцем с подпружиненным поршнем на границе градиента плотности осторожно отсасывали лимфоциты с некоторым количеством фикокол-верографина и переносили чистую пробирку. Ресуспендировали в ЗФР с добавлением 2% ЭТС и трижды отмывали, каждый раз центрифугируя при 1000 g – 10-15 мин, удаляя супернатант и осторожно ресуспендируя клетки в свежих порциях ЗФР + ЭТС. После третьего отмывания клетки ресуспендировали 0,5 мл ЗФР-ЭТС и проводили определение концентрации и жизнеспособности выделенных лимфоцитов в счетной камере Горяева. Жизнеспособность клеток устанавливают путем подсчета процента окрашенных клеток после добавления к капле взвеси клеток, наслоенной на предметное стекло, и добавления раствора 0,5%-ного раствора трипанового голубого. Капли перемешивали, покрывали покровным стеклом и просматривали под микроскопом через 5-7 мин.

Для дальнейших работ готовили рабочую взвесь лимфоцитов с концентрацией клеток  $2 \times 10^6$ /мл в культуральной среде RPMI1640-GLUTAMAX, дополненной 50 мг пенициллина, 50 мг/мл стрептомицина и 5% гепатинактивированной фетальной сыворотки (FCS). Изолированные ПМЯЛ культивировали отдельно или инкубировали с 10 и 100 мг/мл Респиброна в 6-луночных планшетах (Falcon) при 37°C в увлажненной среде, содержащей 5% CO<sub>2</sub> в течение 24 часов. Дозы Респиброна были выбраны на основании литературных данных об эффективности препарата.

В конце инкубации, культуральные супернатанты отделяли и использовали для последующего анализа.

Концентрации TNF- $\alpha$ , IL-2 и IL-10 в культуральных супернатантах измеряли с помощью двухсайтового иммуноферментного анализа (ИФА) с использованием сэндвич-ферментов с использованием коммерческих наборов

реагентов (BEST, Россия) в соответствии с инструкцией производителя. Уровни цитокинов выражали в нг белка на мл.

Статистические значения межгрупповых различий нормально распределенных непрерывных переменных определяли с использованием критерия Стьюдента. Значения  $P < 0,05$  считались статистически значимыми.

**Результаты.** Секрцию цитокинов оценивали с помощью ИФА в культуральных супернатантах, полученных от ПМЯЛ, обработанных респиброном в дозе 100 мкг/мл. Контролем служили супернатанты, полученные от необработанных ПМЯЛ (интактных). Результаты (табл. I) показали, что инкубация в течение 24 часов ПМЯЛ с респиброном в дозе 100 мкг/мл вызывала высвобождение в культуральных супернатантах значительных количеств всех тестируемых цитокинов, в частности IL-10 и IL-2 и ФНО. В контрольных супернатантах наблюдалось очень небольшая концентрация тестируемых цитокинов (или их концентрация была ниже предела чувствительности теста).

Результаты наших экспериментов показали, что действие респиброна *in vitro* на иммунные клетки заключается в активации различных наивных подгрупп лимфоцитов, участвующих как в гуморальном, так и клеточном иммунном ответе. Хорошо известно, что разные паттерны цитокинов продуцируются разными подгруппами лимфоцитов, и что выработка цитокинов CD4-позитивными (CD4+) и CD8-позитивными (CD8+) Т-лимфоцитами обычно демонстрирует фенотип Т-хелперов 1 типа или Т-хелперов 2 типа. Лимфоциты Т-хелперы 1 типа в основном продуцируют интерлейкин-2 (IL2), интерферон- $\gamma$  (IFN $\gamma$ ) и фактор некроза опухоли (TNF- $\alpha$ ), в первую очередь участвуют в воспалительном клеточном иммунитете и необходимы для защиты от различных внутриклеточных инфекций. Лимфоциты Т-хелперы 2 типа продуцируют другие интерлейкины, такие как IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10 и IL-13, и отвечают за регуляцию гуморального иммунитета против определенных внеклеточных инфекций. Предполагается, что поляризация в отношении лимфоцитов типа 1 или типа 2 происходит при первом контакте между антигеном и иммунокомпетентной клеткой.

**Выводы.** Наши результаты подтверждают экспериментальные и клинические исследования, предполагающие, что бактериальные лизаты, подобные респиброну, могут вызывать несколько иммунных ответов против бактериальных антигенов, таким образом обеспечивая эффективный барьер против инвазии патогенных бактерий.