

## Клеточные механизмы иммуномодулирующего действия препарата Иммуномакс

Атауллаханов Р. И., Пичугин А. В., Шишкова Н. М., Мастернак Т. Б., Малкина Е. Ю., Ульянова Л. И., Стеценко О. Н.

ГНЦ – Институт иммунологии МЗ и СР РФ, ООО "Иммафарма", Москва.

Исследованы клеточные механизмы активирующего влияния препарата Иммуномакс на иммунную систему. В условиях культуры клеток периферической крови человека *in vitro* доказано прямое активирующее действие Иммуномакса на NK-клетки и моноциты. Под влиянием Иммуномакса NK-клетки представляют на клеточной поверхности активационные молекулы CD69, моноциты усиленно синтезируют и секретируют цитокины ИЛ-1β, ФНОα и ИЛ-8. Цитолитическая активность NK-клеток повышается после воздействия Иммуномаксом в 3 раза.

Иммуномакс оказывает отсроченное на 24 ч активирующее действие на нейтрофильные гранулоциты крови, что проявляется усилением экспрессии на этих клетках молекул CD69. Активационное действие Иммуномакса на нейтрофилы опосредовано цитокинами (ИЛ-8 и др.), которые вырабатываются активированными моноцитами. Прямого действия на нейтрофилы препарат не оказывает.

Иммуномакс активирует тканевые макрофаги перитонеального экссудата мыши, что выражается в характерном изменении их морфологии и размеров, усилении продукции бактерицидных радикалов в ответ на зимозан, а также снижении активности фермента 5'-нуклеотидазы.

Иммуномакс усиливает продукцию антител при введении лабораторным мышам совместно с чужеродными антигенами, как растворимыми (бычий альбумин, яичный альбумин), так и корпускулярными (гетерологичные эритроциты). Анализ изотипов антител к бычьему альбумину показал, что под влиянием Иммуномакса усиливается продукция всех основных субклассов антител – IgG1, IgG2a, IgG3, IgM и IgG2b.

We studied the cell mechanisms that activate the action of "Immunomax" on the immune system. A direct activating action of the drug on the NK-cells and monocytes was shown for the *in vitro* cell culture of human peripheral blood. Due to "Immunomax" the NK-cells express activated CD69 molecules onto the cell surface; monocytes intensively synthesize and secrete the IL-1β, TNFα and IL-8 cytokines. The cytolytic activity of NK-cells increases 3-fold with "Immunomax". The drug has a delayed (by 24 hours) activating effect on blood neutrophils, which is testified by an intensified expression of CD69 on the above cells. Neutrophils are activated by "Immunomax" via cytokines (e.g. IL-8 etc.) produced by activated monocytes. The drug has no direct action on neutrophils. The mouse peritoneal tissue macrophages were found to be "Immunomax" activation targets as well. Upon activation these cells changed their morphology and size and increased their production of "oxidative burst" antibacterial radicals in response to zymozan; their also attenuated the 5'-nucleotide enzymatic activity. "Immunomax" was inducing the production of antibodies, when administered in experimental mice jointly with soluble (bovine albumin, ovalbumin) and corpuscular (heterologous erythrocytes) antigens. A detailed study of isotopes of antibodies to bovine albumin denoted an "Immunomax"-intensified production of all major subclasses of antibodies - IgG1, IgG3, IgM and IgG2b.

Иммуномакс® – новый иммуномодулирующий препарат, представляющий собой кислый пептидогликан растительного происхождения. Иммуномодулирующее действие препарата заключается в значительном повышении эффективности иммунной защиты при различных инфекциях. В клинической практике Иммуномакс успешно применяется для лечения хронических инфекций, вызванных вирусом папилломы человека, вирусом простого герпеса, хламидией, микоплазмой, а также возбудителями гнойно-септических инфекций [1–7].

В данной работе впервые сообщается о клеточных механизмах активирующего влияния Иммуномакса на иммунную систему. Представлены экспериментальные данные об активации интегральных реакций иммунной системы, раскрыты механизмы действия Иммуномакса на конкретные типы клеток иммунной системы. Идентифицированы клетки и процессы, являющиеся мишенями действия Иммуномакса, подробно описаны дозовые зависимости и кинетика активации.

*Материалы и методы.* Исследовано влияние Иммуномакса на два типа интегральных иммунных реакций – антителообразование в ответ на чужеродные антигены и защиту от бактериальной инфекции. Продукцию антител в экспериментах исследовали у мышей линий СВА, С57BL/6, (СВА×С57BL/6)F<sub>1</sub> и ВАLВ/с. В качестве антигенов для иммунизации мышей применяли бычий сывороточный альбумин (БСА), яичный альбумин (ЯА) и бараньи эритроциты (БЭ). Мышам вводили внутрибрюшинно 2 млн БЭ. Иммунизацию БСА в дозе 200 мкг проводили внутрибрюшинно, повторную иммунизацию той же дозой БСА осуществляли спустя 4 нед. ЯА вводили внутрибрюшинно в дозе 50 мкг, повторные иммунизации ЯА осуществляли через 2 и 4 нед. после первой иммунизации. Образцы крови иммунизированных мышей собирали еженедельно из орбитального синуса, получали сыворотку крови, которую хранили до анализа при 20 °С.

Иммуномакс растворяли в физиологическом растворе 0,9% NaCl, вводили мышам в дозах от 1 до 1000 мкг (в расчете на мышь). При иммунизации мышей БЭ, БСА или ЯА Иммуномакс вводили одновременно с антигеном.

Уровень иммунного ответа у мышей, иммунизированных БЭ, определяли по количеству антителообразующих клеток (АОК), выявляемых в селезенке методом Эрне через 4–5 сут после иммунизации. Кроме абсолютного показателя количества АОК в селезенке, использован также относительный показатель – коэффициент стимуляции: отношение количества АОК в селезенке мышей, иммунизированных БЭ с Иммуномаксом, к количеству АОК у мышей контрольной группы, иммунизированных только БЭ.

Содержание антител, специфичных к ЯА или БСА, в сыворотке крови мышей определяли методом твердофазного ИФА. Для исследования динамики антителообразования методом ИФА в одной постановке изучали сыворотки, полученные через 7, 14, 21 и 28 дней после первичной или повторной иммунизации. Изотип антител, специфичных к БСА, определяли методом ИФА с помощью кроличьих антител, специфичных к IgM, IgG1, IgG2a, IgG2b или IgG3 мыши.

Влияние Иммуномакса на иммунную защиту от инфекции исследовали в модели экспериментальной инфекции, вызванной *Salmonella typhimurium*, у беспородных лабораторных мышей. Эксперименты проводили на мышцах обоего пола массой 12–14 г. Препарат вводили подкожно в разных дозах (3,3, 10 и 30 мкг) за 24 ч до заражения сальмонеллами. Заражение мышей осуществили внутрибрюшинно дозами 10<sup>2</sup>, 10<sup>3</sup>, 10<sup>4</sup> и 10<sup>5</sup> микробных клеток на мыш. Учет гибели животных проводили в течение 20 дней. Эффективность препарата оценивали по его влиянию на выживаемость инфицированных мышей, ЛД<sub>50</sub> (ИД<sub>50</sub>) и продолжительность жизни животных.

Для изучения влияния Иммуномакса на тканевые макрофаги получали клетки перитонеального экссудата (КПЭ) путем промывания брюшной полости мышей (СВА×С57BL/6)F<sub>1</sub> мл среды 199. Полученные от 10–15 мышей КПЭ в концентрации (2– 2,5) • 10<sup>6</sup> в 1 мл собирали в силиконизированные пробирки, перемешивали, разливали по 1,5–2 мл в пластиковые чашки Петри (диаметр 35 мм) и инкубировали 2 ч при 37°С в увлажненной атмосфере с 5% СО<sub>2</sub>.

После инкубации не прилипшие к пластику клетки смывали, а клетки, прикрепившиеся к пластику, дополнительно ополаскивали средой 199. После ополаскивания добавляли 1,5 мл полной среды RPMI 1640, содержащей Иммуномакс в концентрациях от 0,2 до 50 мкг в 1 мл, и инкубировали в указанных условиях 24 ч. По окончании инкубации неприлипшие клетки удаляли, а прилипшие макрофаги фиксировали 96° этанолом и окрашивали азуром и эозином. Клеточный состав оценивали под микроскопом в проходящем свете (ув. 1000), подсчитывая процент макрофагов в 10 полях зрения, дифференцируя их по размерам (большие, средние, малые) и по форме (круглые и распластанные).

Продукцию макрофагами окислительных радикалов исследовали следующим образом. Суспензию КПЭ, полученную, как описано выше, разливали по 1 мл в пробирки хемилуминографа и инкубировали при температуре 37°С в увлажненной атмосфере 5% СО<sub>2</sub> в течение 2 ч. После инкубации неприлипшие клетки смывали, а прикрепившиеся к пробирке клетки 2 раза промывали средой 199. Затем в пробирки вносили по 1 мл полной среды RPMI 1640, содержащей Иммуномакс в концентрациях от 0,2 до 50 мкг в 1 мл, и инкубировали в указанных условиях еще 24 ч. После инкубации убирали надосадочную жидкость, добавляли 0,5 мл буферного раствора (рН 7,2), приготовленного из раствора Хенкса (без фенолового красного), дополненного 5 мМ глюкозы, 10 мМ HEPES-буфера, 0,62 мМ люминола ("Sigma Chemical Co"), и оценивали уровень спонтанной и индуцированной зимозаном хемилуминесценции.

Для определения влияния Иммуномакса на уровень 5'-нуклеотидазы (5'-НТД) перитонеальных макрофагов мышам (СВА×С57BL/6)F<sub>1</sub> вводили внутрибрюшинно раствор 30 мкг Иммуномакса в объеме 0,5 мл. Контрольным животным вводили 0,5 мл физиологического раствора. Через 24 ч после инъекции получали КПЭ путем промывания брюшной полости мышей 5 мл среды 199. Полученные суспензии инкубировали при 37°С в атмосфере 5% СО<sub>2</sub> в течение 2 ч в пластиковых чашках Петри диаметром 100 мм, по 10 мл КПЭ на чашку. После удаления неприлипших клеток оставшиеся прилипшие клетки снимали с поверхности чашки с помощью резинового шпателя, доводили концентрацию КПЭ до 2 млн в объеме 50 мкл. Этот объем суспензии вносили в лунки 96-луночных планшетов, добавляли 5'-аденозинмонофосфат, являющийся субстратом 5'-НТД, и инкубировали 60 мин в указанных выше условиях. Активность фермента определяли фотометрически (длина волны 620 нм) по интенсивности окрашивания молибденового реактива, внесенного в образцы клеток после инкубации. Результаты выражали в единицах оптической плотности в пересчете на 1 млн КПЭ и в виде относительной активности 5'-НТД в процентах от контрольного уровня.

Для изучения влияния Иммуномакса на клетки крови человека у здоровых доноров утром натощак забирали кровь из локтевой вены в пробирки с гепарином натрия с помощью системы "Vacutainer" ("Becton Dickinson") и использовали не позднее чем через 6 ч после получения.

Иммуномакс растворяли в концентрации 1 мг на 1 мл в среде RPMI 1640 и фильтровали через фильтр с размером пор 0,22 мкм. Готовили необходимые разведения препарата в полной среде RPMI 1640 в диапазоне доз от 0,016 до 100 мкг/мл и вносили по 0,2 мл в лунки 48-луночной панели для культивирования клеток ("Nunc"). В качестве отрицательного контроля вносили 0,2 мл полной среды RPMI 1640. Во все лунки добавляли по 0,2 мл цельной гепаринизированной крови. Образцы инкубировали при 37°С в атмосфере с 5% СО<sub>2</sub> в течение 3–48 ч.

После инкубации отбирали по 0,2 мл культуральной жидкости в центрифужные пробирки емкостью 0,5 мл и центрифугировали при 10 000 об/мин в течение 15 мин. Надосадочную жидкость замораживали при -70°С и хранили до определения содержания цитокинов. Клетки, оставшиеся в лунке, переносили в полиэтиленовые пробирки емкостью 1,2 мл для определения поверхностных маркеров активации методом трехцветной лазерной цитофлюориметрии.

Секрецию моноцитарных цитокинов исследовали методом ИФА в культуральной среде. Для измерения

концентрации интерлейкина (ИЛ)-1В использовали набор фирмы "Immunotech" (Франция), для измерения концентраций фактора некроза опухоли  $\alpha$  (ФНО  $\alpha$ ) и ИЛ-8 – наборы фирмы "Innogenetics" (Бельгия). Интенсивность реакции измеряли на автоматическом фотометре "MRX Microplate Reader" ("Dynerx Technology Inc.", США).

Исследование накопления внутриклеточных цитокинов в моноцитах крови человека проводили методом трехцветной лазерной проточной цитофлюорометрии. Цельную кровь разводили в отношении 1:1 в среде RPMI 1640, содержащей различные концентрации Имуномакса и ингибитор секреции клеточных белков брэфельдин А (Sigma) в конечной концентрации 10 мкг/мл. Образцы инкубировали при 37°C в атмосфере с 5% CO<sub>2</sub> в течение 5 ч. После окончания инкубации отбирали по 0,1 мл суспензии и добавляли по 1 мл лизирующе-фиксирующего раствора ("Becton Dickinson"). Выдерживали 15 мин при комнатной температуре. Пробирки центрифугировали 10 мин при 300 g, надосадочную жидкость отбирали, добавляли к клеточному осадку 0,5 мл раствора для повышения проницаемости клеточной мембраны ("Becton Dickinson") и выдерживали 10 мин при комнатной температуре. После добавления 5 мл изотонического раствора, содержащего 0,5% БСА и 0,1% азида натрия, клетки осаждали центрифугированием (10 мин при 300 g), надосадочную жидкость удаляли. К клеточному осадку добавляли по 5 мкл антител. Для определения содержания ИЛ-1В в моноцитах использовали следующие антитела: анти-ИЛ-1В-ФИТЦ ("Kaltac"), анти-CD14-PE ("Kaltac") и анти-CD45-PerCR ("Becton Dickinson"). Аналогичным образом определяли внутриклеточное содержание ФНО в моноцитах.

Методом трехцветной лазерной проточной цитометрии исследовали появление раннего маркера активации на НК-клетках после воздействия Имуномаксом. Инкубацию венозной крови донора в присутствии Имуномакса проводили, как описано выше. После инкубации 0,05 мл образца крови помещали в полиэтиленовую пробирку емкостью 1,2 мл. Вносили по 5 мкл следующих антител: CD16-ФИТЦ ("Сорбент"), анти-CD69-фикоэритрин ("Pharmingen"), анти-CD3-PerCR ("Becton Dickinson"). Пробирки встряхивали в течение 5 с, а затем инкубировали при комнатной температуре в темноте в течение 20 мин. В каждую пробирку приливали по 1 мл лизирующе-фиксирующего раствора ("Becton Dickinson") и выдерживали 15 мин при комнатной температуре. Пробирки центрифугировали 10 мин при 300 g, надосадочную жидкость отбирали и разводили клеточный осадок в 0,5 мл изотонического раствора. Анализ флюоресценции осуществляли на проточном лазерном цитофлюорометре "Calibur" ("Becton Dickinson") с использованием программного обеспечения "Cell Quest".

Цитолитическую активность НК-клеток изучали по следующей методике. Из цельной гепаринизированной крови выделяли мононуклеарную фракцию путем центрифугирования (30 мин при 300 g и комнатной температуре) в ступенчатом градиенте плотности фиколла ("Pharmacia"). Выделенные клетки отмывали в среде 199 и разводили до концентрации 2 млн в 1 мл среды RPMI 1640, содержащей 10% фетальной телячьей сыворотки, 20 мМ HEPES-буфера (pH 7,4) и 10 мкг/мл гентамицина (полная среда – ПС). В лунки 12-луночного планшета ("Nunc") вносили по 1 мл клеточной суспензии, затем добавляли по 1 мл ПС (контроль) или 1 мл раствора Имуномакса (20 мкг/мл) или 1 мл раствора ИЛ-2 (20 МЕ/мл, "Cetus"). Образцы инкубировали в течение 3 ч при 37°C в атмосфере с 5% CO<sub>2</sub>. После инкубации клетки собирали в центрифужные пробирки, осаждали центрифугированием (10 мин при 300 g) и доводили их концентрацию до 5 млн в 1 мл ПС. Полученные клетки служили эффекторами цитолиза. Серию двукратных разведений в ПС клеток-эффекторов разливали по 0,1 мл в триплетах в лунки 96-луночного круглодонного планшета. Во все лунки добавляли по 10 тыс. меченных <sup>3</sup>H-уридином клеток-мишеней K-562 в объеме 0,1 мл ПС. Смесь клеток-эффекторов и клеток-мишеней инкубировали в течение 4 ч при 37°C в атмосфере с 5% CO<sub>2</sub>. После инкубации клетки переносили на бумажные фильтры с помощью сборщика клеток "Titertek Cell Harvester 550" и подсчитывали радиоактивность на счетчике "Wallac 1409".

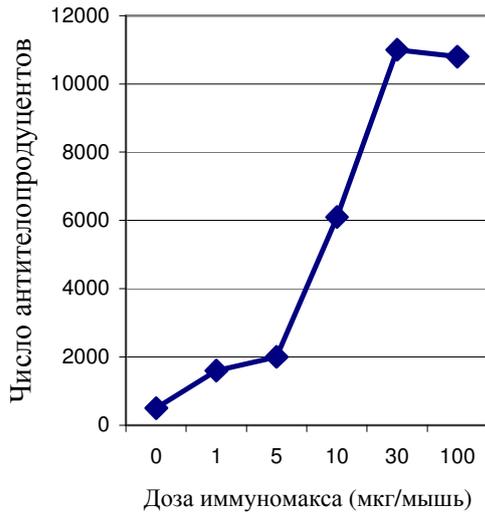
## Результаты и обсуждение.

### Активация синтеза антител под влиянием Имуномакса

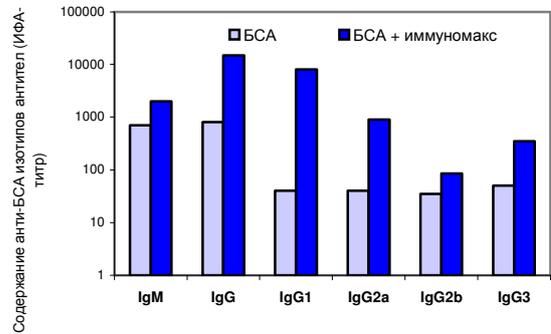
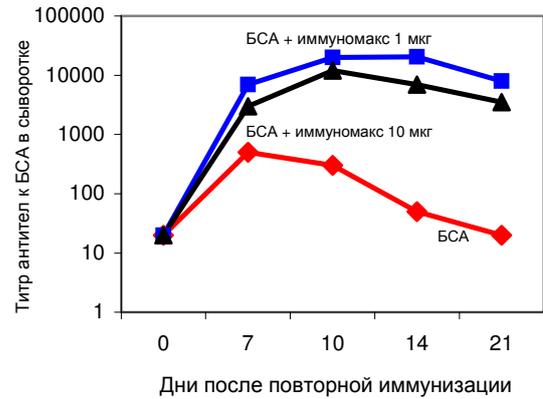
В экспериментах по изучению влияния Имуномакса на продукцию антител против чужеродных антигенов установлено, что введение препарата одновременно с чужеродным антигеном вызывает значительное усиление интенсивности продукции антител, специфичных к введенному антигену.

Совместное введение Имуномакса с гетерологичным антигеном экспериментальным мышам вызывало значительно более интенсивную иммунную реакцию, чем при введении только антигена. Так, инъекция Имуномакса вместе с субоптимальной иммуногенной дозой БЭ приводила к 10-кратному усилению продукции антителопродукторов, специфичных к БЭ (рис. 1).

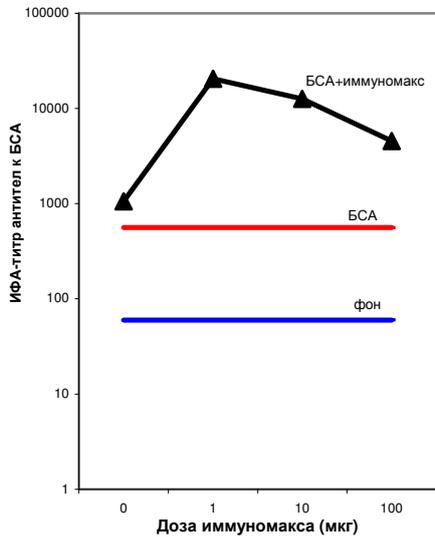
После иммунизации БСА в сочетании с Имуномаксом титр (ИФА-титр) специфичных к БСА антител в сыворотке крови мышей достигал 1:20000 (рис. 2), что было намного выше уровня специфичных антител при иммунизации только БСА (ИФА-титр не более чем 1:500). При введении Имуномакса существенно увеличивалась не только интенсивность, но и продолжительность вторичной иммунной реакции на БСА (см. рис. 2, а). При этом доминировали изотипы антител IgG1, IgG2а и IgG3. Продукция IgM и IgG2b, специфичных к БСА, повышалась под влиянием Имуномакса в меньшей степени (рис.2, б).



**Рис. 1. Иммуноадьювантное действие иммуномакса на продукцию антител у мышей при совместном введении препарата с гетерологичными эритроцитами (БЭ). Мыши (СВАхС57В1)F<sub>1</sub> иммунизированы 2 млн БЭ внутрибрюшинно.**



**Рис. 2. Продукция антител к БСА после совместного введения БСА и иммуномакса**



**Рис. 3. Зависимость иммуноадьювантного эффекта иммуномакса от его дозы при индукции антителогенеза к БСА. Иммуномакс вводили внутрибрюшинно с антигеном 200 мкг БСА при первичной иммунизации. Спустя 30 дней, вводили 200 мкг БСА без иммуномакса.**

Иммуноадьювантный эффект отчетливо зависел от дозы Иммуномакса (см. рис. 2, а и рис. 3). При вторичной реакции на БСА оптимальной иммуностимулирующей оказалась доза Иммуномакса 1 мкг, при первичной иммунной реакции на гетерологичные эритроциты – доза 10 мкг и более.

Исследование влияния Иммуномакса в модели антителообразования к ЯА проводили совместно с проф. В. Бесслером (Институт иммунологии, Фрайбург, ФРГ). Полученные результаты представлены в табл. 1 и на рис. 4. ЯА оказался сильным иммуногеном для мышей BALB/c, титр антител после введения 50 мкг ЯА без какого-либо адьюванта достигал 1:13000. Совместное введение Иммуномакса с 50 мкг ЯА вызывало существенное повышение уровня антительного ответа (титр 1:22000). Иммуномакс оказывал такое же по силе иммуноадьювантное действие, как и известный иммуноадьювант липопептид Pam<sub>3</sub>Cys-Ser-Lys<sub>4</sub> (титр 1:20000), но уступал адьюванту Фройнда (титр 1:33000).

## Усиление защиты от бактериальной инфекции под влиянием Иммуномакса

Влияние Иммуномакса на иммунную защиту от инфекции исследовали, как описано в разделе "Материалы и методы", в модели экспериментальной инфекции, вызванной *Salmonella typhimurium* у лабораторных мышей. Полученные результаты представлены в табл. 2, из которой следует, что однократное подкожное введение Иммуномакса в дозах от 10 до 30 мкг вызывало значительное повышение неспецифической устойчивости мышей к инфекции. Возрастали процент выживших животных, средняя продолжительность жизни инфицированных мышей и особенно – доза инфекции, приводящая к 50% гибели ИД<sub>50</sub>. Все это свидетельствовало о выраженном иммуномодулирующем действии препарата.

Таблица 1. Сравнение иммуoadъювантного действия Иммуномакса, липопептида и адъюванта Фройнда в модели продукции антител, специфичных к ЯА, у мышей BALB/c

Антиген	Препарат	Доза, мкг	Способ введения	Макс. титр антител к ЯА
АЯ, 50 мкг	-	-	-	13000
АЯ, 50 мкг	Иммуномакс	20	внутрибрюшинно	22000
АЯ, 50 мкг	Липопептид	20	внутрибрюшинно	20000
АЯ, 50 мкг	Адъювант Фройнда	250	п/к	33000

Таблица 2. Влияние Иммуномакса на устойчивость мышей к заражению *S. typhimurium*

Препарат	Доза	Способ введения	Выживаемость, %	ИД <sub>50</sub>	Продолжительность жизни
Физиологический раствор	0,5 мл	Подкожно	30	501 (200-1258)	11,4
Иммуномакс	3,3 мкг	Подкожно	32,5	630 (251-2512)	12,0
	10 мкг	Подкожно	37,5	1000 (316-3162)	11,6
	30 мкг	Подкожно	52,5	3981 (1258-12589)	13,1

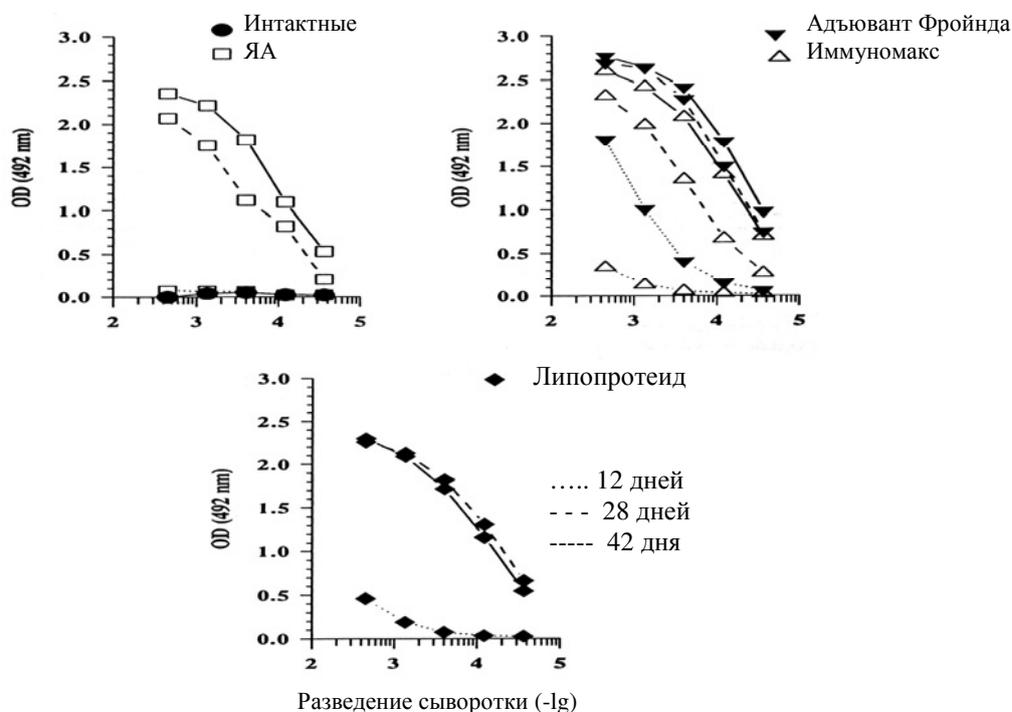


Рисунок 4. Сравнение иммуoadъювантного действия Иммуномакса, липопептида и адъюванта Фройнда в модели продукции антител к ЯА у мышей BALB/c. Сыворотки до иммунизации и через 14, 28, 42 дн. после иммунизации ЯА тестировали в ИФА на содержание антител, специфичных к ЯА.

Эксперименты с сальмонеллезной инфекцией у мышей демонстрируют одно из интегральных проявлений иммуномодулирующего действия Имуномакса на уровне иммунитета как системы, а не на его отдельные звенья. К таким же интегральным проявлениям относится и активация антителообразования, так как антителообразование – это сложный многодневный процесс, в котором участвуют многие типы клеток, взаимодействующие между собой, пролиферирующие и дифференцирующиеся. В следующих разделах данной статьи рассматривается влияние Имуномакса на конкретные типы клеток или клеточные процессы, имеющие важнейшее значение в интегральных иммунных процессах.

### Активация тканевых макрофагов

Тканевые макрофаги мыши, полученные из перитонеального экссудата, значительно активируются при их культивировании *in vitro* в присутствии Имуномакса. Активация макрофагов проявляется изменением их размеров и формы, а также их метаболической и ферментативной активностей.

#### Изменение морфологических свойств макрофагов

КПЭ получали у мышей (СВА×С57BL/6)F<sub>1</sub>, и инкубировали в присутствии Имуномакса, как описано в разделе "Материалы и методы". Учет морфологических характеристик макрофагов показал, что под влиянием Имуномакса происходило уменьшение содержания распластанных форм макрофагов при одновременном возрастании количества клеток округлой формы. При этом установлено двукратное увеличение процента крупных макрофагов округлой формы, что свидетельствует об активации большой популяции тканевых макрофагов в условиях прямого воздействия на эти клетки Имуномаксом *in vitro*. Активирующее влияние на макрофаги было зарегистрировано в широком диапазоне концентраций Имуномакса – от 0,6 до 50 мкг/мл.

#### Продукция макрофагами окислительных радикалов

Встречаясь с микробами, макрофаги вырабатывают перекиси и окислительные радикалы, с помощью которых они эффективно убивают бактерии и другие микроорганизмы. Это один из самых действенных механизмов макрофагальной защиты. Установлено, что Имуномакс значительно повышает способность макрофагов к продукции окислительных метаболитов при встрече с компонентами микроорганизмов.

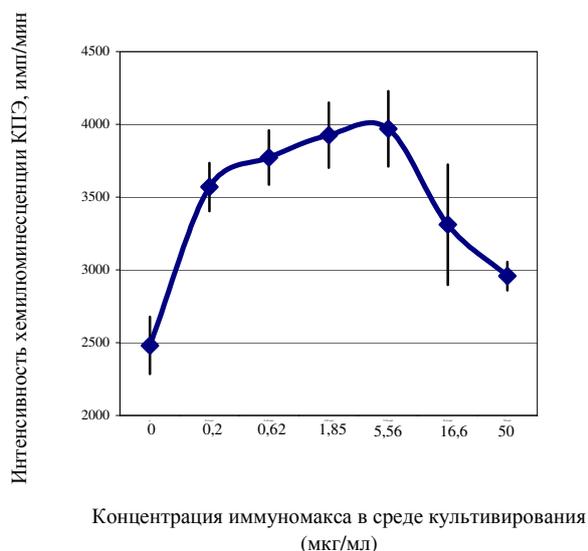


Рис. 5. Интенсивность хемилюминесценции клеток (имп/мин) перитонеального экссудата в ответ на опсонизированный зимозан после предварительного культивирования клеток в присутствии Имуномакса.

Результаты изучения влияния Имуномакса на продукцию активных радикалов и перекисей по интенсивности хемилюминесценции представлены на рис. 5. Инкубация перитонеальных макрофагов в присутствии Имуномакса в течение 24 ч не влияла на уровень их спонтанной хемилюминесценции, но значительно (на 50%) повышала способность клеток к продукции окислительных метаболитов в ответ на зимозан. При этом увеличение хемилюминесцентной активности наступает уже при концентрации Имуномакса 0,2 мкг/мл, а максимальный эффект достигается при концентрации 5,5 мкг/мл, что хорошо согласуется с концентрацией Имуномакса, приводящей к максимальной активации макрофагов, если судить по их морфологическим признакам.

## Активность 5'-НТД на поверхности макрофагов

Определение уровня фермента 5'-НТД является одним из информативных способов оценки активации макрофагов. Установлено, что снижение активности данного фермента под влиянием иммуномодуляторов характеризует наличие у препаратов иммуноадьювантных свойств и хорошо согласуется с их высокой противомикробной активностью.

Влияние Иммуномакса на активность 5'-НТД сравнивали с активностью иммуномодулятора полиоксидония, который хорошо известен как активатор фагоцитов (табл. 3). Полученные результаты свидетельствуют об эффективной активации макрофагов *in vivo* как Иммуномаксом, так и полиоксидонием. При этом Иммуномакс превосходил препарат сравнения по своему активационному действию на макрофаги. Так, под влиянием полиоксидония активность 5'-НТД снижалась в 2 раза, а под влиянием Иммуномакса – в 6 раз, достигая 16% от контрольного уровня. Эти данные могут свидетельствовать как об активации резидентных макрофагов, так и о привлечении в место введения новых активных макрофагов с высоким бактерицидным потенциалом.

**Таблица 3. Активность 5'-НТД перитонеальных макрофагов через 24 ч после внутрибрюшинного введения иммуномодуляторов.**

Препарат, введенный внутрибрюшинно за 24 ч	Оптическая плотность (на 1 млн клеток)	Активность 5'-НТД, % от контрольного уровня
Физиологический раствор	0,300 ± 0,009	100 ± 0,9
Иммуномакс	0,048 ± 0,002	16 ± 0,7
Полиоксидоний	0,152 ± 0,004	51 ± 1,3

**Рис. 6. Определение внутриклеточного содержания ИЛ-1β в моноцитах крови методом трехцветной лазерной проточной цитофлуориметрии на цитометре FACS Calibur фирмы Becton Dickinson.**

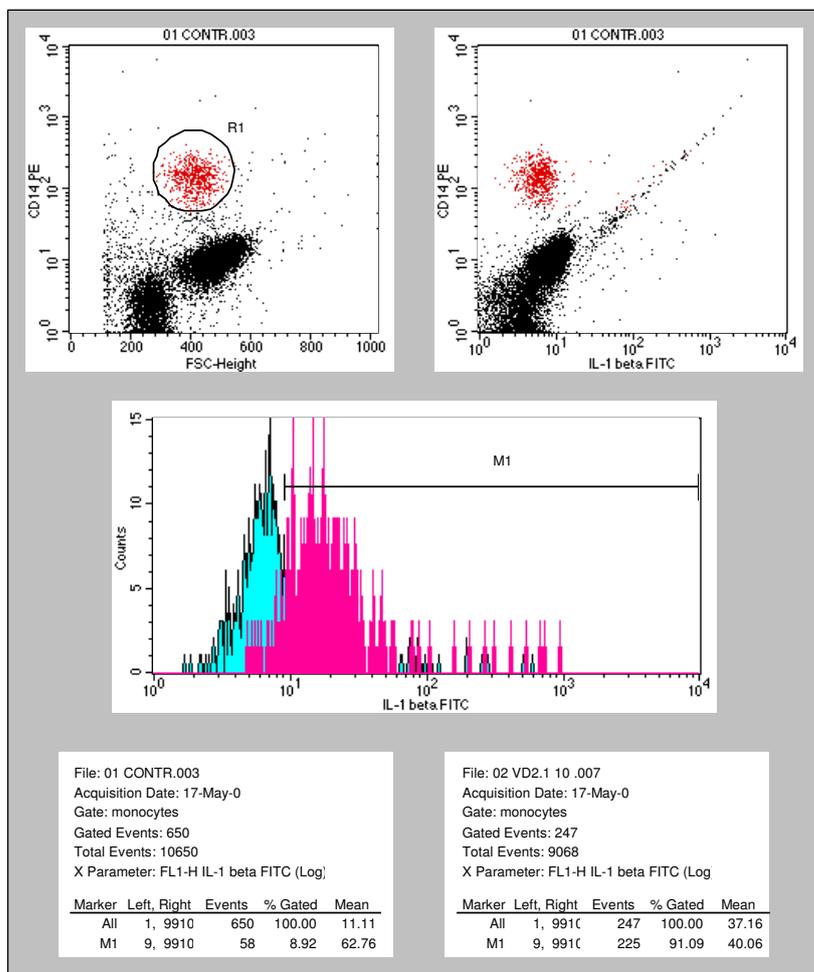
Цельную кровь инкубировали 5 часов с добавлением Иммуномакса (10 мкг/мл) в присутствии ингибитора транспорта белка брэфельдина А (10 мкг/мл), затем обрабатывали раствором, повышающим проницаемость клеточной мембраны (*permeabilising solution*) и окрашивали смесью трех антител: анти ИЛ-1β FITC, анти CD14 PE и анти CD45 PerCP.

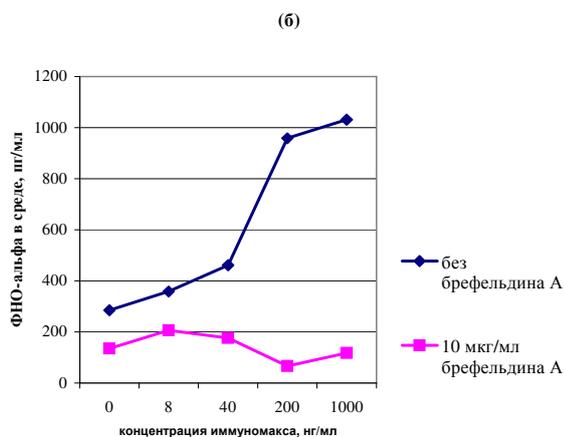
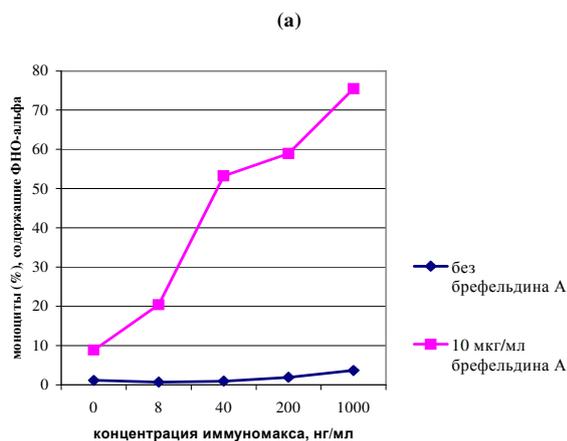
R1 – моноциты. На гистограмме приведено содержание ИЛ-1β в моноцитах. В контроле 8,92% моноцитов содержат ИЛ-1β, при воздействии Иммуномаксом процент позитивных клеток возрастает до 91,09% и среднее содержание ИЛ-1β на одну клетку возрастает с 11,11 до 37,16 относительных единиц.

## Активация моноцитов человека

Активирующее влияние Иммуномакса на моноциты периферической крови человека исследовали по усилению продукции ИЛ-1β, ФНО α и ИЛ-8. На рис. 6 представлены результаты определения внутриклеточного содержания ИЛ-1β в моноцитах. Цельную кровь инкубировали в течение 5 ч в присутствии 10 мкг/мл Иммуномакса и без препарата (отрицательный контроль). Для блокирования секреции белков в суспензию был добавлен брэфельдин А, поэтому все синтезируемые секреторные белки накапливались внутри клеток. На рис. 6 видно, что в контрольных культурах (светлая гистограмма) ИЛ-1β детектировался в 9% моноцитов, а в культурах, в которые был внесен Иммуномакс (темная гистограмма), уже через 5 ч инкубации 91% моноцитов содержали внутриклеточный ИЛ-1β.

На рис. 7 показана концентрационная зависимость влияния Иммуномакса на продукцию ФНОα в моноцитах. Из представленных данных следует, что Иммуномакс стимулирует выработку ФНОα в





**Рис.7. Иммуномакс индуцирует моноциты человека к продукции ФНО-альфа. Инкубация цельной крови в течение 5 часов с добавлением или без добавления ингибитора транспорта белка брэфельдина А. Определение внутриклеточного содержания ФНО-альфа в моноцитах крови проводили методом трехцветной лазерной проточной цитофлуориметрии на цитометре FACS Calibur фирмы «Becton Dickinson»**

зависимость активации NK-клеток от концентрации Иммуномакса. Уже такие низкие концентрации, как 10 нг/мл, вызывали существенную активацию NK-клеток, а при концентрации около 100 нг/мл достигалась активация 50% NK-клеток.

Таким образом, NK-клетки высокочувствительны к действию Иммуномакса. Как и моноциты, они могут являться ведущей клеточной мишенью Иммуномакса при введении терапевтических доз препарата человеку.

NK-клетки активируются Иммуномаксом напрямую, а не вследствие воздействия цитокинов, секретируемых активированными моноцитами. Это было установлено в специальных экспериментах. При инкубации цельной крови в присутствии ингибитора транспорта белка брэфельдина А, когда продуцируемые цитокины в среду не секретируются (см. рис. 7, б), уже через 5 ч инкубации в присутствии 1 мкг/мл Иммуномакса 30% NK-клеток экспрессировали активационную молекулу CD69.

моноцитах и что именно моноциты являются источником ФНО $\alpha$  в среде. Действительно, если в инкубационную среду добавлен ингибитор транспорта белка, то мы видим дозозависимое нарастание уровня ФНО $\alpha$  внутри моноцитов (см. рис. 7) и фоновое содержание ФНО $\alpha$  в среде (рис. 7, б). Если же ингибитор транспорта белка отсутствует, то накопления ФНО $\alpha$  в моноцитах не происходит, а его концентрация в среде нарастает прямо пропорционально концентрации препарата (см. рис. 7). Дозовая зависимость накопления ФНО $\alpha$  в моноцитах показывает, что уже при концентрации Иммуномакса 8 нг/мл моноциты заметно усиливают синтез ФНО $\alpha$  (см. рис. 7, а).

На рис. 8 представлена дозовая зависимость выработки различных цитокинов от концентрации Иммуномакса. Установлено, что уже при дозе 0,4 мкг/мл происходит довольно интенсивная выработка ИЛ-1 $\beta$ , ФНО $\alpha$  и ИЛ-8. Если сравнить выработку этих цитокинов в абсолютных концентрациях, то ИЛ-8 вырабатывается в несколько раз больше, чем ИЛ-1 $\beta$  и ФНО $\alpha$ .

#### Активация NK-клеток человека

Об активации NK-клеток судили по раннему маркеру активации – белку CD69, который может регистрироваться на поверхности NK-клеток уже через 2 ч после их активации [8]. На рис. 9, где показан результат измерения активационного ответа NK-клеток крови на воздействие Иммуномаксом, видно, что только 7% NK-клеток экспрессировали CD69 в отсутствие Иммуномакса, а при воздействии Иммуномаксом в концентрации 10 мкг/мл практически все NK-клетки (96%) были активированы.

На рис. 10 приведены данные, характеризующие зависимость активации NK-клеток от концентрации Иммуномакса. Уже такие низкие концентрации, как 10 нг/мл, вызывали существенную активацию NK-клеток, а при концентрации около 100 нг/мл достигалась активация 50% NK-клеток.

## Усиление цитолитической активности НК-клеток

После воздействия Иммуномаксом на клетки крови человека *in vitro* мы исследовали цитолитические свойства НК-клеток по их способности лизировать клетки миелолейкоза K562 (клетки-мишени). Данные, представленные на рис. 11, свидетельствуют о том, что Иммуномакс значительно усиливает цитолитическую активность НК-клеток. Для сравнения на рис. 11, представлены данные по экспрессии CD69 на поверхности клеток-эффекторов после их предварительной инкубации в присутствии Иммуномакса и без него. Как видно на рис. 11 после 3-часовой инкубации клеток-эффекторов в присутствии Иммуномакса 29% НК-клеток экспрессировали CD69, т. е. были активированы. Тестирование цитолитических свойств клеток-эффекторов, предварительно активированных Иммуномаксом, против клеток-мишеней K562 показало резкое нарастание способности НК-клеток к лизису клеток-мишеней. Это заметно при низких значениях отношения эффектор/мишень, в частности, при 6,25 и 12,5, когда эффективность лизиса возрастала под влиянием Иммуномакса приблизительно в 3 раза. Если сравнивать действие Иммуномакса с действием ИЛ-2, который является известным стимулятором НК-клеток, то видно, что по экспрессии CD69 и лизису клеток-мишеней K562 Иммуномакс в несколько раз более эффективен.

## Активация гранулоцитов человека

При изучении влияния Иммуномакса на экспрессию активационных маркеров на различных типах клеток было обнаружено, что активационный маркер CD69 экспрессируется не только на моноцитах и НК-клетках, но и на гранулоцитах. Исследование кинетики активации показало (рис. 12), что в первые несколько часов воздействия Иммуномаксом, когда более 60% НК-клеток уже активировано, активации гранулоцитов еще не происходит. Только через 24 ч инкубации в присутствии Иммуномакса активация гранулоцитов становилась значительной – к этому сроку около 60% гранулоцитов экспрессировали CD69.

Отсроченная активация гранулоцитов, скорее всего, связана с отсутствием прямого действия Иммуномакса на эти клетки.

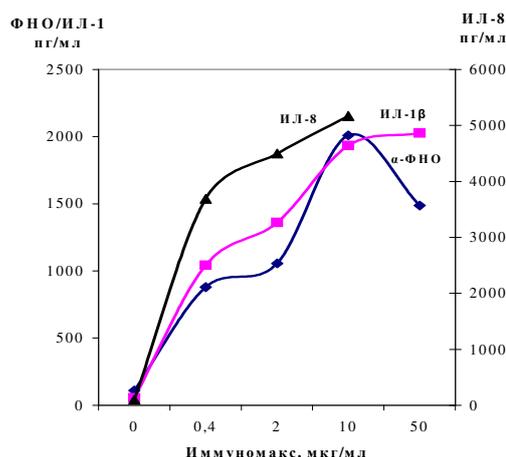


Рис. 8. Иммуномакс индуцирует продукцию α-ФНО, ИЛ-1β и ИЛ-8 моноцитами человека. Клетки периферической крови инкубировали в присутствии указанных концентраций Иммуномакса. Содержание цитокинов во внеклеточной среде измеряли методом ИФА через 20 час (ИЛ-8) или 48 час (α-ФНО, ИЛ-1β) инкубации.

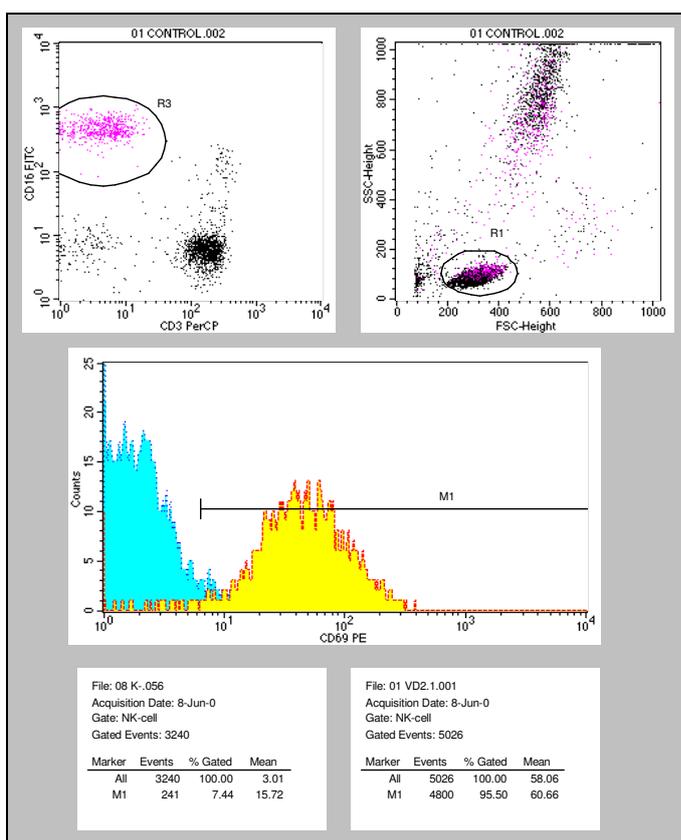
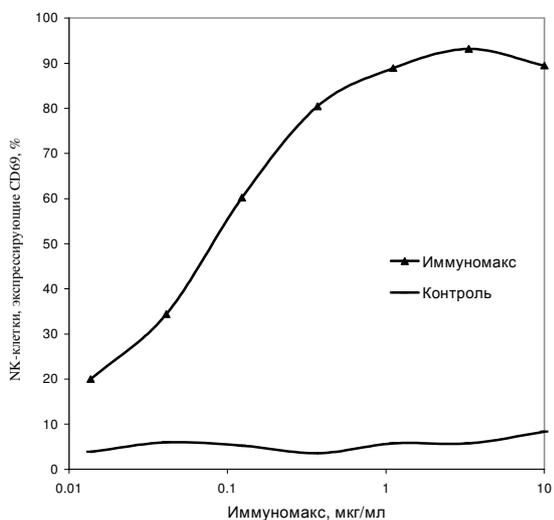


Рис. 9. Определение активационного состояния НК-клеток методом трехцветной лазерной проточной цитофлуориметрии на цитометре FACS Calibur фирмы Becton Dickinson.

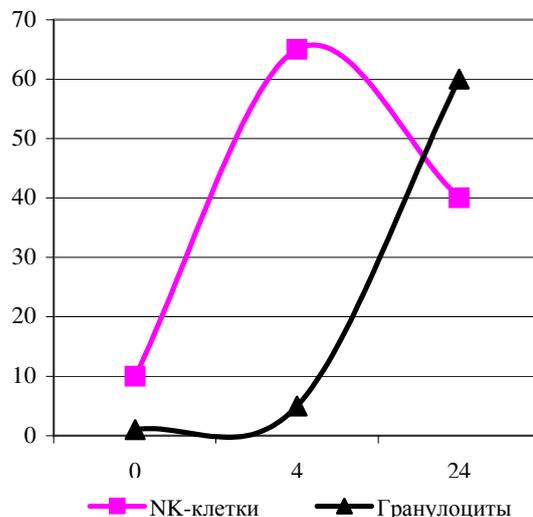
Цельную кровь инкубировали 16 часов с Иммуномаксом (10 мкг/мл) и затем окрашивали смесь трех антител: анти-CD16 FITC, анти-CD69 PE и анти-CD3 PerCP.

R1 – зона лимфоцитов, определяемая по параметрам светорассеяния вперед (FSC) и под прямым углом (SSC). НК-клетки выделяли по условию одновременного попадания в зону R1 (лимфоциты) и R3 – клетки, несущие Fc-гамма рецептор CD16, но не несущие CD3 маркер Т-лимфоцитов. На гистограмме приведена экспрессия ранней активационной молекулы CD69 в контроле (7,44% позитивных НК-клеток) и при воздействии Иммуномаксом (95,5% позитивных НК-клеток).

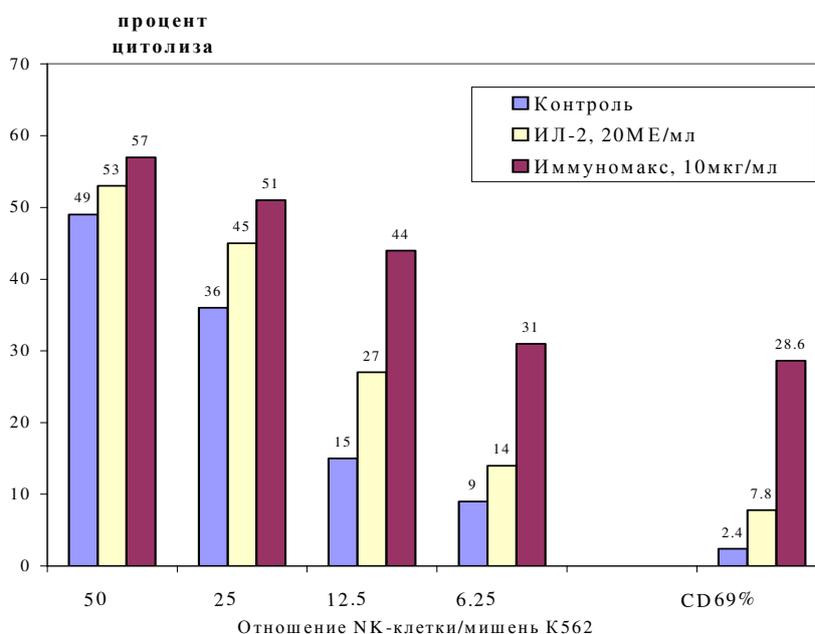
Препарат, по-видимому, не действует прямо на гранулоциты, но эти клетки активируются цитокина-ми, которые выделяют в среду моноциты, высокочувствительные к активационному действию Иммуномакса. Как видно на рис. 8, через 1 сут инкубации, т. е. к моменту активации гранулоцитов, в среде накапливается несколько цитокинов, но наибольшей концентрации (5 нг/мл) достигает ИЛ-8, который известен как фактор активации гранулоцитов.



**Рис.10.** Влияние Иммуномакса на активационное состояние NK-клеток. Кровь человека инкубировали в течение 16 часов в присутствии различных концентраций Иммуномакса. Активацию NK-клеток определяли методом трехцветной лазерной проточной цитофлуорометрии по экспрессии активационной молекулы CD69 на поверхности.



**Рис.12.** Кинетика активации NK-клеток и гранулоцитов при инкубации крови человека в присутствии 5 мкг/мл иммуномакса. По оси абсцисс - время, ч, по оси ординат - процент клеток, экспрессирующих CD69



**Рис.11.** Влияние Иммуномакса на активационное состояние и цитолитическую активность NK-клеток. Мононуклеарную фракцию лейкоцитов человека инкубировали 3 часа в присутствии 10 мкг/мл Иммуномакса или 20 МЕ/мл ИЛ-2. Определяли экспрессию активационной молекулы CD69 на поверхности NK-клеток и процент лизиса клеток-мишеней K562 при различных соотношениях эфektor : мишень.

## Заключение

Представленные в данной работе результаты исследований свидетельствуют о том, что Иммуномакс является эффективным иммуномодулятором. Введение препарата в организм экспериментальных животных вызывает значительное усиление интегральных реакций иммунной системы, таких, как антите-лообразование и защита от инфекции. При этом значительно возрастает не только интенсивность иммунных реакций, специфичных в отношении конкретных антигенов (БЭ, БСА, ЯА), но и эффективность неспецифических механизмов иммунной защиты от инфекции.

В условиях культуры клеток человека *in vitro* исследованы клеточные механизмы иммуномодулирующего действия Иммуномакса. Установлено, что под влиянием Иммуномакса первыми активируются НК-клетки и моноциты. Уже через 3–4 ч после воздействия Иммуномаксом на поверхности 30–60% НК-клеток появляется маркер активации CD69, значительно (в 3 раза) повышается цитолитическая активность НК-клеток.

Признаки активации моноцитов обнаруживаются в первые часы после воздействия Иммуномаксом. Около 70–80% моноцитов крови человека начинают накапливать внутриклеточный ИЛ-1 $\beta$  и ФНО $\alpha$  под влиянием Иммуномакса. Именно моноциты являются источником цитокинов ИЛ-1 $\beta$ , ФНО $\alpha$  и ИЛ-8, концентрация которых во внеклеточной среде возрастает в десятки раз после активации клеток крови Иммуномаксом.

Секреция указанных выше цитокинов моноцитами обеспечивает вовлечение дополнительных типов клеток. В частности, значительная продукция ИЛ-8, по-видимому, активирует гранулоциты, поскольку ИЛ-8 является фактором активации гранулоцитов.

## Литература

1. Буданов П. В. Проблемы терапии рецидивирующего генитального герпеса. // Вопр. гинекол., акуш. и перинатол. – 2004. Т. 3, № 4. - С. 94-98.
2. Новиков А. Г., Логунова З. В., Потеев Н. Н. Опыт применения иммуномодулятора "Иммуномакс". // Русский медицинский журнал, 2004. Т. 12, № 13. – С. 819–820.
3. Перламутров Ю. П., Соловьев А. М., Атауллаханов Р. Р. и др. Применение активатора противовирусного иммунитета в комплексной терапии рецидивирующих остроконечных кондилом. // Иммунопатол., алергол., инфектол. – 2003. № 3. – С. 138–141.
4. Соловьев А. М. Консервативная терапия поражений, вызванных папилломавирусной инфекцией. // Лечащий врач. - 2003. - № 7. - С. 22-26.
5. Соловьев А. М., Перламутров Ю. П., Атауллаханов Р. И., Пичугин А. В. Обоснование и опыт применения иммунотерапии при лечении рецидивирующих остроконечных кондилом. //Трудный пациент. – 2004. Т. 2, № 6. – С. 34–37.
6. Тищенко А. Л., Сергеева Н. С., Крапин М. Ю. Иммуномакс в терапии рецидивирующей генитальной папилломавирусной инфекции. // Лечащий врач. – 2003. – № 7. – С. 1526–1527.
7. Чадаев А. П., Нуртисов А. М. Иммуномодуляторы Иммуномакс и Гепон в комплексном лечении больных с острой гнойной хирургической инфекцией. // Фарматека. – 2004. № 16 (93). - С. 89-94.
8. Hamman J., Fiebig P., Strauss M. Expression of the early activation antigen CD69, a type II integral membrane protein with a C-type lectin domain. // J. Immunol. 1993. – Jun 1, 150(11). – P. 4920-4927