**Оценка специфической активности иммуномодулирующего устройства на основе клеток *Saccharomyces cerevisiae* в стендовых экспериментах**

Рябцева Т.В., Седёлкина Е.Л., Кирковский В.В., Бычко Г.Н.

*Белорусский государственный медицинский университет,*

*научно-исследовательская часть, научная группа гемо- и лимфосорбции,*

*г.Минск, Беларусь*

**Актуальность.** Иммунотерапия представляет интерес для врачей всех специальностей в связи с неуклонным ростом инфекционно-воспалительных заболеваний, склонных к хроническому и рецидивирующему течению на фоне низкой эффективности проводимой базовой терапии.В настоящее время выделяют по происхождению шесть основных групп иммуномодуляторов:микробные, тимические, костномозговые, цитокины, нуклеиновые кислоты и химически чистые [1].

Иммуномодуляторы микробного происхождения условно можно разделить на три поколения. Первым препаратом, разрешенным к медицинскому применению в качестве иммуностимулятора, была вакцина БЦЖ, обладающая выраженной способностью усиливать факторы как врожденного, так и приобретенного иммунитета.К микробным препаратам первого поколения можно отнести и такие лекарственные средства, как пирогенал и продигиозан, представляющие собой полисахариды бактериального происхождения. В настоящее время из-за пирогенности и других побочных эффектов они применяются редко.К микробным препаратам второго поколения относятся лизаты (Бронхомунал, ИPC-19, Имудон, сравнительно недавно появившийся на российском фармацевтическом рынке препарат швейцарского производства Бронхо-Ваксом) и рибосомы (Рибомунил) бактерий, относящихся в основном к числу возбудителей респираторных инфекций *Klebsiellapneumoniae, Streptococcuspneumoniae, Streptococcuspyogenes, Haemophilusinfluezae*и др. Эти препараты имеют двойное назначение специфическое (вакцинирующее) и неспецифическое (иммуностимулирующее). К микробным препаратам третьего поколения можно отнести Ликопид, который состоит из природного дисахарида – глюкозаминилмурамила и присоединенному к нему синтетического дипептида – L-аланил-D-изоглутамина.В организме главной мишенью для иммуномодуляторов микробного происхождения являются фагоцитарные клетки. Под влиянием этих препаратов усиливаются функциональные свойства фагоцитов (повышаются фагоцитоз и внутриклеточный киллинг поглощенных бактерий), возрастает продукция провоспалительных цитокинов, необходимых для инициации гуморального и клеточного иммунитета [1,2,3].

Не останавливаясь на характеристике иммуномодуляторов остальных групп целью данной работы являлось изучение биологической активности полученного из клеток *Saccharomyces cerevisiae* активатора. Данный активатор предполагается использовать в дальнейшем в качестве лиганда для иммобилизации на твердый носитель и синтеза модуля для изучения возможности экстракорпоральной иммуномодуляции.

**Цель:** изучить изменение экспрессии на поверхности иммунокомпетентных клеток доноров маркеров клеточной адгезии (CD162, CD177) и активации клеток (CD69, CD281, CD282, CD286) после взаимодействия с иммуномодулирующим устройством.

**Материалы и методы.** В эксперименте использовали 3 мл цельной гепаринизированной крови и 5 мл полимерной матрицы с пришитым активирующим лигандом в концентрации 2 мг/мл. Инкубировали 90 минут при 37°С. Затем с помощью метода проточной цитофлуориметрии определяли экспрессию маркеров на поверхности нейтрофилов. Нормальный уровень экспрессии маркеров регистрировали после инкубации цельной крови полимерной матрицы без лиганда 90 минут при 37°С. Статистическую обработку и построение графиков – GraphPadPrism6.

**Результаты и обсуждение.** Активирующая способность разработанного иммуномодуля была подтверждена изменением экспрессии маркеров активации на нейтрофилах и моноцитах после контакта крови доноров с активирующим лигандом, пришитым на полиакриламидную матрицу (табл. 1, 2, 3).

Таблица 1

Изменение экспрессии 281+282+ иммунокомпетентных клеток крови после взаимодействия с иммуномодулем

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| Вид клеток | ПАГ | ПАГ+ГП дрожжей | ПАГ+лизат дрожжей |
| Нейтрофилы | 0,44 (0,32;1,64) | 0,71 (0,58;4,69) | 4,48 (1,63;6,71)\* |
| Моноциты | 94,6 (78,2;96,4) | 97,0 (82,3;98,1) | 98,9 (95,7;99,8)\* |
| Лимфоциты | 0,038 (0,022;0,065) | 0,069 (0,041;0,098) | 0,086 (0,082;0,093) |
| \*- достоверная разница при сравнении с группой ПАГ, р≤0,05 | | | |

Процент нейтрофилов, экспрессирующих CD281+282+, увеличился в 4 раза после контакта крови с иммуномодулем. Таким образом, нейтрофилы после взаимодействия с лигандом, пришитым на матрицу, становятся активными и способными к распознаванию антигена. Димеризация Толл-лайк 1 (CD281) и Толл-лайк 2 (CD282) способствует распознаванию липопротеинов бактерий, пептидогликанов грамположительных микроорганизмов, а также компонентов клеточной стенки грибов.

Таблица 2

Изменение экспрессии 162+ иммунокомпетентных клеток крови после взаимодействия с иммуномодулем

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| Вид клеток | ПАГ | ПАГ+ГП дрожжей | ПАГ+лизат дрожжей |
| *1* | *2* | *3* | *4* |
| Нейтрофилы | 100,0 (96,3;100,0) | 100,0  (94,1;100,0) | 97,6  (96,7;98,5)\* |
| *1* | *2* | *3* | *4* |
| Моноциты | 90,9 (75,60;98,30) | 83,4  (81,52;88,36) | 84,7 (82,36;87,11)\* |
| Лимфоциты | 91,8  (90,2;96,4) | 94,1  (91,1;95,3) | 93,2  (92,6;97,3) |
| \*- достоверная разница при сравнении с группой ПАГ, р≤0,05 | | | |

После контакта крови с иммуномодулем можно ожидать увеличение хемотаксиса иммунокомпентных клеток к очагу воспаления, так как в наших исследованиях было показано увеличение экспрессии CD 177 на нейтрофилах, моноцитах и лимфоцитах периферической крови доноров, который согласно данным литературы опосредует хемотаксис нейтрофилов под действием некоторых активаторов [70].

Таблица 3

Изменение экспрессии 177+ иммунокомпетентных клеток крови после взаимодействия с иммуномодулем

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| Вид клеток | ПАГ | ПАГ+ГП дрожжей | ПАГ+лизат дрожжей |
| Нейтрофилы | 79,4 (75,3;81,6) | 79,8  (76,0;88,2) | 97,3  (95,8;99,3)\* |
| Моноциты | 47,3 (44,6;48,1) | 53,7  (50,8;60,7) | 58,3  (57,4;63,2)\* |
| Лимфоциты | 54,5 (53,1;59,8) | 59,4  (55,8;64,1) | 62,1  (60,7;65,9)\* |
| \*- достоверная разница при сравнении с группой ПАГ, р≤0,05 | | | |

**Выводы.** Таким образом, при контакте клеток крови с разработанным и синтезированным иммуномодулем, содержащим в качестве лиганда компонент клеток *Saccharomyces cerevisiae*, происходит активация иммунокомпетентных клеток крови доноров, что подтверждается изменением экспрессии на поверхности клеток маркеров активации и молекул адгезии. Иммуномодуль может быть использован у пациентов с хроническими гнойными инфекциями для активации клеточного иммунитета.

**Литература**

1. UlrichJ.H. Sachs, CorneliaL. Andrei-Selmer / Theneutrophil-specificantigenCD177 isacounter-receptorforplateletendothelialcelladhesionmolecule-1 (CD31) // TheJ. Ofbiologicalchemistry, V.282, № 32, pp. 23603-23612
2. Zarbock A., Müller H., Kuwano Y., Ley K.PSGL-1-dependent myeloidleukocyteactivation. J. Leukoc. Biol., 2009, №86, рр.1119–24
3. Hashizume M., Higuchi Y., Uchiyama Y. / IL-6 plays an essential role in neutrophilia under inflammation // Cytokine, 2011, N54, p.92-99
4. Iwasaki A., Medzhitov R. / Toll-like receptor control of the adaptive immune responses // Nature immunology, 2004, V.5, N10, p.987-995