

ՀՀ ԳԱԱ «ՀԱՅԿԵՆՍՍԱՏԵԽՆՈԼՈԳԻԱ» ԳԱԿ ՊՈԱԿ

ՍՈՒՔԻԱՍՅԱՆ ԱՆՆԱ ԳՈՒՐԳԵՆԻ

IL-1 β և IL-10 ՄԻՆԹԵԶԻ ԻՆԴՈՒԿՑԻԱՅԻ և ՌԵԳՈՒԼՅԱՑԻԱՅԻ
ՈՒՍՈՒՄՆԱՍԻՐՈՒԹՅՈՒՆԸ ՄԱՐԴՈՒ ՊԵՐԻՖԵՐԻԿ ԱՐՅԱՆ
ԿՈՒԼՏԻՎԱՑՎՈՂ ԲԶԻԶՆԵՐԻ ՄԻՋՈՑՈՎ *LACTOBACILLUS ACIDOPHILUS*
“ՆԱՐԻՆԵ”-Ի և ԱՅԼ ԿԵՆՍԱԲԱՆԱԿԱՆ ԱԿՏԻՎ ՆՅՈՒԹԵՐԻ
ԱԶԴԵՑՈՒԹՅԱՄԲ

Գ.00.06 – “Վիրուսաբանություն, իմունաբանություն” մասնագիտությամբ
կենսաբանական գիտությունների թեկնածուի
գիտական աստիճանի հայցման ատենախոսության

ՄԵՂՍԱԳԻՐ

Երևան – 2011

НИИ «АРМБИОТЕХНОЛОГИЯ» НАН РА ГНКО

СУКИАСЯН АННА ГУРГЕНОВНА

ИЗУЧЕНИЕ ИНДУКЦИИ И РЕГУЛЯЦИИ СИНТЕЗА IL-1 β И IL-10
КУЛЬТИВИРУЕМЫМИ КЛЕТКАМИ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА
ПОД ВЛИЯНИЕМ *LACTOBACILLUS ACIDOPHILUS* "НАРИНЕ" И ДРУГИХ
БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ СОЕДИНЕНИЙ

А В Т О Р Е Ф Е Р А Т

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук по специальности
03.00.06 – “Вирусология, иммунология”

Ереван – 2011

Ատենախոսության թեման հաստատվել է ՀՀ Առողջապահության Նախարարության Ա.Բ.Ալեքսանյանի անվան համաճարակաբանության, վիրուսաբանության և բժշկական մակաբուծության ԳՀԻ գիտական խորհրդում:

Գիտական ղեկավար՝

ՀՀ ԳԱԱ ակադեմիկոս, պրոֆեսոր
Յու.Թ. Ալեքսանյան

Պաշտոնական ընդդիմախոսներ՝

բ.գ.դ., պրոֆեսոր Վ.Ա. Մկրտչյան

կ.գ.թ. Դ.Ա. Պողոսյան

Առաջատար կազմակերպություն՝ ՀՀ ԳԱԱ Հ. Բունիայանի անվ. կենսաքիմիայի ինստիտուտ:

Ատենախոսության պաշտպանությունը կայանալու է 2011թ. նոյեմբերի 11-ին, ժամը 14.00 ՀՀ ԳԱԱ «Հայկենսատեխնոլոգիա» ԳԱԿ-ում գործող ՀՀ ԲՈՀ-ի 018 մասնագիտական խորհրդի նիստում:

Հասցե՝ 0056, ՀՀ ք. Երևան, Գյուրջյան փ. 14, հեռ/ֆաքս՝ (37410) 654183:

Ատենախոսությանը կարելի է ծանոթանալ ՀՀ ԳԱԱ «Հայկենսատեխնոլոգիա» ԳԱԿ գրադարանում:

Սեղմագիրն առաքված է 2011թ. հոկտեմբերի 11-ին:

Մասնագիտական խորհրդի գիտական քարտուղար,
կենսաբանական գիտությունների թեկնածու՝

Գ.Ե. Ավետիսովա

Тема диссертации утверждена на заседании ученого совета НИИ эпидемиологии, вирусологии и медицинской паразитологии им. А.Б.Александряна МЗ РА

Научный руководитель:

академик НАН РА, профессор
Ю.Т. Александряна

Официальные оппоненты:

д.м.н., профессор В.А. Мкртчян

к.б.н. Д.А. Погосян

Ведущая организация: Институт биохимии им. Г.Буниятыяна НАН РА.

Защита диссертации состоится 11 ноября 2011г. в 14.00 часов на заседании специализированного совета 018 ВАК РА при НППЦ «Армбиотехнология» НАН РА.

Адрес: 0056, РА, г.Ереван, ул. Гюрджяна 14, тел/факс: (37410) 654183

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке НППЦ «Армбиотехнология» НАН РА.

Автореферат разослан 11 октября 2011г.

Ученый секретарь специализированного совета,
кандидат биологических наук

Г.Е. Аветисова

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность:

Иммунная система играет решающую роль в процессе формирования резистентности организма к инфекции. В этом аспекте значительный интерес представляет регуляция иммунного ответа и продукция цитокинов. Генеральной функцией иммунной системы является поддержание морфофункциональной целостности организма. Защита от инфекций осуществляется с помощью двух систем - неспецифического (врожденного) и специфического (приобретенного) иммунитета. Неспецифический иммунитет выступает как первая линия защиты, а система приобретенного иммунитета выполняет функции специфического распознавания “чужеродного”, формирования иммунологической памяти и регуляции индукции врожденного иммунитета. Система врожденного иммунитета действует на основе воспаления и фагоцитоза. Сложная система приобретенного иммунитета основана на специфических функциях лимфоцитов, распознающих чужеродные макромолекулы и реагирующих на них либо непосредственно, либо выработкой защитных специфических белковых молекул – антител (Г.И. Абелев, 1996; В.Г. Галактионов, 1998). Иммунная система, существующая у позвоночных животных, объединяет органы и ткани, которые защищают организм от заболеваний, идентифицирует и уничтожает опухолевые клетки и патогены. Иммунная система распознает множество разнообразных возбудителей, от вирусов до паразитических червей, и отличает их от биомолекул собственных клеток. Распознавание возбудителей усложняется их адаптацией и эволюционным развитием новых методов успешного инфицирования организма-хозяина. Конечной целью иммунной системы является уничтожение чужеродного агента, которым может оказаться безответственный микроорганизм, инородное тело, ядовитое вещество или переродившаяся клетка самого организма. Этим достигается биологическая индивидуальность организма (Р.В. Петров, 1987; Р.М. Хайтов и др., 2000; Ch.A. Jeneway, P. Travers, 1994; C. Auffray et al., 2009). На функцию иммунной системы оказывает влияние достаточно большое количество экзогенных и эндогенных факторов. Результатом воздействия этих факторов является изменение функциональной активности системы, либо активация всей системы или отдельных ее звеньев, либо ее супрессия. Чрезмерное (длительное и мощное) воздействие факторов, угнетающих или стимулирующих иммунную систему, приводит к развитию иммунологической недостаточности, которая может проявляться в цитокиновой дисрегуляции, нарушении функционирования клеточной и гуморальной систем иммунитета и факторов естественной резистентности организма (Г.И. Абелев, 1996; В.Г. Галактионов, 1998).

Всё большее внимание исследователей привлекает нестволовая популяция клеток крови - моноциты. Моноциты обладают выраженной фагоцитарной функцией, причем их образование происходит в костном мозге. В кровь выходят не окончательно созревшие клетки, которые обладают самой высокой способностью к фагоцитозу. Это самые крупные клетки периферической крови. Они могут поглощать относительно крупные частицы и клетки и, как правило, не погибают после фагоцитоза. Этим они отличаются от нейтрофилов и эозинофилов, способных поглощать лишь относительно небольшие частицы и, как правило, погибающих после фагоцитоза. Моноциты способны фагоцитировать

микробы в кислой среде, когда нейтрофилы неактивны (Ch.A. Jeneway, P. Travers, 1994; В.Г. Галактионов, 1998). Моноциты - это лейкоциты циркулирующей крови, которые играют важную роль при воспалительной реакции, необходимой для врожденного иммунитета.

За последнее десятилетие появляется все больше работ ученых России и других зарубежных стран, посвященных иммуностимулирующему действию лактобактерий (В.М. Бондаренко и др., 1998; H.S. Gill et al., 2000; I.Peluso et al., 2007.). Большой интерес представляет обзорная статья специалистов из НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф. Гамалеи В.М.Бондаренко и др. (1998), где авторы пишут, что "одной из важных функций нормальной микрофлоры является ее иммуностимулирующее действие, связанное с участием в поддержании "рабочего состояния специфических и неспецифических, гуморальных и клеточных механизмов иммунитета, имеющих местное и общее проявление". Здесь ставится во внимание "анализ данных об иммуномодулирующей способности молочнокислых бактерий – представителей рода *Lactobacillus* и возможном их противоопухолевом действии. Установлено, что под влиянием лактобактерий изменялись следующие показатели иммунитета: усиливалась активность клеток моноцитарно-макрофагального ряда, фагоцитоз, активность натуральных киллеров, увеличивалась продукция сывороточных иммуноглобулинов и интерферона, стимулировались реакции Т-клеточного иммунитета". Далее авторы пишут, что "жизнеспособные лактобактерии, используемые для изготовления кисломолочных продуктов, также активируют иммунокомпетентные клетки, что показано при наблюдении у людей". Лактобактерии непатогенны и полезны для здоровья человека, а также могут индуцировать пролиферацию иммунных клеток и повышать синтез антител к патогенным микроорганизмам (M. Miettinen et al., 1996).

В развитии межклеточного взаимодействия на фоне антигенной стимуляции важно отметить роль таких цитокинов, как IL-1 β и IL-10, которые регулируют межклеточные и межсистемные взаимодействия, определяют выживаемость клеток, стимуляцию или подавление их роста, дифференцировку, функциональную активность и апоптоз, а также обеспечивают согласованность действия иммунной, эндокринной и нервной систем как в нормальных условиях, так и при воздействии патологических факторов (С.А.Кетлинский, Н.М.Калинина, 1995; D.Male et al., 2006).

Подходы к усилению продукции IL-10 остаются не до конца исследованными, между тем как *L. acidophilus* "Нарине", ДК, и такие биологически активные соединения, как бактериальные PGN, LPS, рекомбинантные цитокины IL-4 и TNF- γ , GM-CSF, TLR и NLR рецепторы регулируют продукцию цитокинов, в том числе IL-10 и IL-1 β (С.А. Кетлинский и др., 1992; E.Weiss et al., 2004; J.T.Soller, 2007; A.O`Garra, P.Vieira, 2007).

Основной целью настоящей работы являлось изучение индукции и регуляции синтеза IL-1 β и IL-10 культивируемыми моноцитами и ДК человека под влиянием *L. acidophilus* "Нарине", цитокинов и агонистов TLR и NLR рецепторов.

Задачи исследования.

Изучить влияние *L. acidophilus* "Нарине" на индукцию синтеза IL-1 β и IL-10 и фагоцитарную активность культивируемых моноцитов человека.

Изучить влияние рекомбинантных цитокинов и агонистов TLR и NLR рецепторов на индукцию синтеза IL-1 β и IL-10 культивируемых моноцитов человека.

Изучить влияние *L. acidophilus* "Нарине", рекомбинантных цитокинов и агонистов TLR и NLR рецепторов на индукцию эндотоксиновой толерантности моноцитов человека *in vitro*.

Изучить влияние рекомбинантных цитокинов, бактериальных LPS на продукцию IL-10 зрелыми и незрелыми культивируемыми ДК человека.

Научная новизна работы:

Впервые выяснено влияние *L. acidophilus* "Нарине", PGN, цитокинов, LPS и агонистов на индукцию синтеза IL-1 β и IL-10 и фагоцитарную активность культивируемых моноцитов человека

Впервые установлено влияние *L. acidophilus* "Нарине", PGN, цитокинов, LPS и агонистов на индукцию эндотоксиновой толерантности культивируемых моноцитов человека.

Впервые обнаружено влияние рекомбинантных цитокинов и бактериальных LPS на продукцию IL-1 β , IL-10 и экспрессию кластеров дифференцировки зрелыми и незрелыми культивируемыми ДК человека.

Практическое значение работы:

Результаты проведенных исследований позволили выявить подходы к регуляции продукции IL-1 β и IL-10 под влиянием *L. acidophilus* "Нарине" и агонистов TLR и NLR рецепторов, что открывает возможности для использования вышеуказанных соединений в качестве иммуностимулирующих средств при лечении инфекционных болезней.

Личный вклад соискателя. Собственный вклад включает экспериментальную реализацию сформулированных задач, поиск и анализ научной литературы по теме, обобщение результатов исследований, оформление научных статей и диссертационной работы. Постановка основных задач, разработка методологии и результаты исследований прорабатывались и обсуждались под руководством академика НАН РА и заведующего лабораторией эпидемиологии и иммунологии НИИ эпидемиологии, вирусологии и медицинской паразитологии им. А.Б.Алексяна МЗ РА Алексяна Ю.Т. и д.б.н., заведующего лабораторией исследовательского центра "Арменикум" Давтяна Т.К.

Место выполнения работы. Работа выполнена в исследовательском центре "Арменикум".

Апробация диссертации состоялась на расширенном заседании Ученого Совета НИИ Эпидемиологии, вирусологии и медицинской паразитологии им. А.Б.Алексяна, Министерства Здравоохранения Республики Армения.

Основные результаты диссертации доложены на научно-практической конференции с международным участием "Актуальные вопросы эпидемиологии инфекционных болезней" Ереван-2005, 2009.

Публикации.

По теме диссертационной работы опубликовано 8 научных публикаций.

Структура и объем диссертации.

Диссертация изложена на 105 страницах русского текста компьютерного набора, содержит 15 рисунков и состоит из введения, обзора литературы, материалов и

методов исследования, результатов исследования, их обсуждения и выводов. Список литературы включает 216 источников.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

1. Агонисты TLR и NLR.

MDP- лиганд NOD2 (фирма InvivoGen – 3950 Sorrento Valley Blvd. Suite A, San Diego, CA 92121 – USA), для исследования версия # 06B24-МТ, содержит 5мг MDP + 2 мл стерильной эндотоксин-несодержащей воды.

PGN-EB – пептодогликан из E.coli 0111:B4 (фирма InvivoGen – 3950 Sorrento Valley Blvd. Suite A, San Diego, CA 92121 – USA), для исследования версия # 05G15-МТ, содержит 1мг пептодогликан из E.coli 0111:B4 + 3 × 2 мл стерильной эндотоксин-несодержащей воды.

Pam3CSK4 – лиганд TLR2-TLR1 (фирма InvivoGen – 3950 Sorrento Valley Blvd. Suite A, San Diego, CA 92121 – USA), для исследования версия # 06B24-МТ, содержит 1мг Pam3CSK4 + 3HCl + 2 мл эндотоксин-несодержащей воды.

LPS – липополисахарид из E.coli 026:B6 (eBioscience, Sigma Chemical Co., Louis, MO).

IL-1 β – тест комплект Ready-SET-Go (eBioscience).

IL-4 – (eBioscience).

IL-10 – тест комплект Ready-SET-Go (eBioscience)

TNF- α , **IFN- γ** , **колхицин** – реагенты были приобретены у фирмы InvivoGen (San Diego, USA).

2. Бактерии *L. acidophilus*.

Для культивации бактерий *L. acidophilus* (коллекционный номер ЦДМ – ИНМИА 9602) “Нарине” (авторское свидетельство 163-573 Л.А.Ерзнкян) использовали лактобакагар (мясной экстракт-10,00 г/л, дрожжевой экстракт-5.00 г/л, глюкоза -20.00 г/л, твин-80-1.00 г/л, аммония цитрат-2.00 г/л, натрия ацетат - 5.00 г/л, магния сульфат-0.10 г/л, марганца сульфат -0.05г/л, натрия гидрофосфат-2.00 г/л, агар-агар-12.00 г/л, pH (при 25°C) 6,5 ± 0,2). После посева переносили чашки Петри в термостат при 37°C на 4 суток. Собирали бактерии, добавляя в чашки фосфатно-буферный раствор (PBS), разводили и переливали в стерильную пробирку. Промывали дважды центрифугированием при 3000 об/мин 7 минут. Определяли мутность специальным устройством с оптической плотностью 600 нм (1.5), что соответствует 5×10⁸ клеток в 6 мл. Для культивирования *L. acidophilus* применяли питательную среду RPMI-1640, содержащей 10% эмбриональную телячью сыворотку (FCS), 2 ммоль L-глутамина, 1 ммоль пирувата натрия, 100 Е/мл пенициллина и 100 мкг/мл стрептомицина. При проведении эксперимента использовали 5 пробирок, одна из которых контрольная, куда добавляли лишь моноциты и питательную среду. В остальные 4 пробирки, кроме моноцитов и среды, добавляли также разные концентрации бактерий (3.125×10³; 6.25×10³; 12.5×10³; 25×10³). Пробирки переносили в термостат при 37°C на ночь. На следующий день собирали супернатанты центрифугированием при 3000 об/мин 7 минут и хранили в холодильнике при температуре -80°C.

3. Количественное определение фагоцитоза гранулоцитов и моноцитов.

Периферическую кровь 5-ти здоровых доноров возрастной группы от 29-и до 43-х лет забирали утром в специальных пробирках, содержащих литий-гепарин (LithHem heparin, Vacuet, Greiner). Максимальная разница времени между

заборами составляла 0,5-1,5 ч. При поступлении в лабораторию образцы периферической крови немедленно были разделены на аликвоты в стерильные пластиковые пробирки по 0,5-1 мл. Первую часть образцов помещали в специальные пробирки для определения основных гематологических показателей периферической крови с помощью автоматического клеточного анализатора Celly v2.20 (Hycel Diagnostics).

Цитофлюориметрическое определение количества фагоцитирующих моноцитов и нейтрофилов проводили при помощи тест-системы Phagotest производства фирмы Orpegen Pharma. В экспериментах использовали свежeweделенную и необработанную кровь здоровых доноров, а также предварительно обработанную различными препаратами в течение 1-3 ч при 37°C цельную периферическую кровь. Для этого к 100 мкл цельной крови добавляли DEXTRAN-FITC в концентрации 5мкг/мл, и пробы нормализовали по отношению к абсолютному содержанию гранулоцитов в образцах. Пробы инкубировали при 37°C в течение 10 мин, а контрольные пробы (технический контроль) оставляли на льду. Реакцию фагоцитоза останавливали, добавляя лизирующий раствор. После удаления эритроцитов лизирующим раствором во избежание появления артефактов при подсчете агрегированных бактерий, ДНК фагоцитов окрашивали витальной краской – пропидий йодидом. Количество фагоцитирующих клеток и интенсивность процесса фагоцитоза определяли на цитофлюориметре FACS Calibur™ с пакетом программы CellQuest (Becton Dickinson) в параметрах SSC-FL1 (DEXTRAN-FITC), FSC-FL3 (пропидий йодид) и соответствующих гистограммах, отдельно для каждой популяции клеток.

4. Влияние бактерий *L. acidophilus* на фагоцитарную активность культивируемых моноцитов человека.

Нами были использованы 5 пробирок, одна из которых контрольная, т.е. туда добавляли лишь моноциты и питательную среду RPMI 1640 для культивирования клеток. В остальные 4 пробирки, кроме моноцитов и среды, добавляли также разные количества бактерий *L. acidophilus* в объеме 1-го мкл ($0,3125 \times 10^6$; $0,625 \times 10^6$; $1,25 \times 10^6$; $2,5 \times 10^6$; 10×10^6 ; 20×10^6 ; 40×10^6).

При изучении влияния указанных препаратов на фагоцитарную активность нейтрофилов и моноцитов цельной крови, аликвоты образцов по 1 мл инкубировали в присутствии различных концентраций препаратов в течение 1-3 ч при 37°C. После завершения инкубации, проводили гематологический анализ крови на автоматическом анализаторе, с целью подсчета абсолютного содержания нейтрофилов и моноцитов. После нормализации соотношения DEXTRAN-FITC/клетки-эффeкторы проводили проточную цитофлюориметрию.

5. Моноциты периферической крови здоровых доноров.

Была использована гепаринизированная периферическая кровь 12-ти здоровых доноров. Моноциты периферической крови здоровых доноров выделяли с помощью центрифугирования в градиенте плотности (histopaque), содержащей 6% CO₂ (Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo), при 1500 об/мин в течение 45 мин при 25°C. Мононуклеары промывали 2 раза PBS и добавляли 1 мл, описанной выше, питательной среды. Затем инкубировали в термостате при 37°C в течение 50 минут. После окончания инкубации удаляли не адгезирующие на пластик лимфоциты, а к клеткам добавляли либо LPS, либо *L. acidophilus*, и инкубировали 18 часов при 37°C. Собирали супернатанты центрифугированием при 3000 об/мин

7 минут и хранили в холодильнике при температуре -80°C . Пробирки отмывали PBS и добавляли питательную среду или LPS и инкубировали в термостате при 37°C 5 часов, после чего, снова собирали супернатанты центрифугированием при 3000 об/мин 7 минут и хранили в холодильнике при температуре -80°C .

6. Активация моноцитов лигандами TLR И NLR.

Была использована гепаринизированная периферическая кровь 7-ми здоровых доноров. Образцы сыворотки хранились при температуре -80°C . Концентрации IL-10 и IL-1 β в сыворотке крови определяли методом ИФА с применением рекомбинантного человеческого IL-10 (с целью калибровки метода). Тестовый набор Ready-SET-Go (eBioscience) использовали согласно рекомендациям производителя. Моноциты периферической крови здоровых доноров (3 мужчин и 4 женщины) выделяли с помощью центрифугирования в градиенте плотности ficoll-hypaque (histopaque) (Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo), при 1500 об/мин в течение 45 мин при 25°C в атмосфере, содержащей 6% CO₂. Моноциты (95% CD14) промывали 3 раза эндотоксин-несодержащим PBS и культивировали при 5×10^5 кл/мл плотности в среде RPMI-1640. Затем пробирки инкубировали в термостате при 37°C в течение 1.5 часа. После окончания инкубации удаляли не адгезирующие на пластик лимфоциты, а к клеткам добавляли либо по 2.5 мкг/мл PGN из E.coli 0111: B4 (NOD1 и NOD2 лиганд), либо по 2.5 мкг/мл Pam3CSK4 (TLR2-TLR1 лиганд), либо по 5 мкг/мл MDP (NOD2 лиганд), а в качестве контроля добавляли питательную среду и инкубировали в течение 3-х дней. Все реагенты были приобретены у InvivoGen (San Diego, USA). Собирали супернатанты центрифугированием при 3000 об/мин 7 минут и хранили в холодильнике при температуре -80°C . Для оценки гибкости моноцитов, 5×10^5 клеток в 1 мл RPMI-1640 среде инкубировали с рекомбинантными молекулами IL-4 (10 нг/мл, eBioscience) или 100 нг/мл LPS из E. coli 026:B6 (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) в течение 3-х дней, после чего снова собирали супернатанты центрифугированием при 3000 об/мин 7 минут и хранили в холодильнике при температуре -80°C . Концентрацию IL-1 β и IL-10 исследовали методом ИФА, используя тест SET-Go (eBioscience).

7. Изучение пластичности активации моноцитов.

Была использована гепаринизированная периферическая кровь 7-и здоровых доноров. Моноциты периферической крови здоровых доноров выделяли с помощью центрифугирования в градиенте плотности histopaque (Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo), при 1500 об/мин в течение 45 мин при 25°C . Мононуклеары промывали 2 раза PBS и добавляли 1 мл питательной среды RPMI-1640. Затем инкубировали в термостате при 37°C , содержащей 6% CO₂, в течение 1.5 часов. После окончания инкубации удаляли не адгезирующие на пластик лимфоциты, а к клеткам добавляли либо LPS, либо IL-4, а в качестве контроля - добавляли питательную среду и инкубировали в течение 3-х дней. Собирали супернатанты центрифугированием при 3000 об/мин 7 минут и хранили в холодильнике при температуре -80°C . Пробирки отмывали PBS и рестимулировали противоположными про- и противовоспалительными молекулами или добавляли питательную среду и инкубировали в термостате при 37°C , содержащей 6% CO₂, в течение 3-х дней, после чего снова собирали супернатанты центрифугированием при 3000 об/мин 7 минут и хранили в холодильнике при температуре -80°C .

Поверхностную экспрессию CD205 исследовали методом проточной цитофлюориметрии. Клетки после 3-х дней инкубации, переносили в специальные BD (Becton Dickinson) пробирки и добавляли по 3 мкл CD205-FITC. Инкубировали в темном месте в течение 30 минут, после чего промывали PBS и исследовали методом проточной цитофлюориметрии.

Концентрацию IL-10 определяли в культуральном супернатанте методом ИФА, используя тест-систему SET-Go (eBioscience).

8. Эндотоксиновая толерантность.

Эндотоксиновая толерантность моноцитов периферической крови была исследована у 9-ти здоровых доноров, путем измерения продукции провоспалительных цитокинов (IL-1 β) моноцитами, в ответ на LPS после предварительной инкубации в присутствии или в отсутствии двух доз LPS. Моноциты, которые были промыты 3 раза эндотоксин-несодержащим PBS, в количестве 5 \times 10⁵ кл/мл плотности культивировали в питательной среде в течение 18 ч. в присутствии или отсутствии 100 нг/мл LPS, или, живых бактерий *L. acidophilus* (1 \times 10³ кл/мл), или 2,5 мкг/мл PGN или 5 мкг/мл MDP или 10 нг/мл рекомбинантного IL-4. После первых 18 ч. культивации клетки промывали три раза эндотоксин-несодержащим PBS и далее культивировали в течение дополнительных 4 ч. в присутствии 1 мкг/мл LPS. В конце культивации собирали супернатанты центрифугированием при 3000 об/мин 7 минут, а эндотоксиновую толерантность исследовали методом ИФА определяя продукцию IL-1 β , IL-10, IFN- γ и TNF- α , используя готовый набор теста Ready-SET-Go (eBioscience), согласно рекомендациям производителя.

9. Проточная цитофлюориметрия.

Моноциты были обработаны 0,3 мкг FITC анти-CD36 (Serotec) или IgM-FITC и зафиксированы 1% параформальдегидом (Becton Dickinson). Обработанные клетки инкубировали с 1% FACS permeabilizing раствором (реагент, который увеличивает проницаемость клеточных мембран) (Becton Dickinson) и с фикоэритрин (PE) - конъюгированным IL-10 (eBioscience). Полученные ДК промывали и обрабатывали 0,3 мкг FITC- конъюгированным анти-CD206 и биотин-конъюгированным анти-CD86 (eBioscience), а затем фикоэритрин (PE) - конъюгированным стрептавидином, или, фикоэритрин (PE) - конъюгированным анти-CD14 и биотин-конъюгированным Annexin V, или стрептавидин-FITC (eBioscience). Клетки фиксировали 1% параформальдегидом и подвергали FACS анализу используя Becton Dickinson FACSCalibur цитофлюориметр с CellQuest™ software (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA).

10. Выделение и активация ДК.

Была использована гепаринизированная периферическая кровь 4-х здоровых доноров. Для получения незрелых ДК (iDCs), моноциты культивировали в течение 6 дней с GM-CSF (10 нг/мл) и IL-4 (10 нг/мл), как это первоначально описывает M.A. Morse et al. (1997). In vitro полученные зрелые ДК (mDCs) инкубировали с GM-CSF (10 нг/мл), IL-4 (10 нг/мл) и провоспалительным TNF- α (10 нг/мл) и культивировали в течение 6 дней. После 6 дней инкубации клетки промывали и добавляли среду с 100 нг/мл LPS или 2 мкг/мл колхицина и инкубировали 24 ч. После чего собирали супернатанты центрифугированием при 3000 об/мин 7 минут и хранили в холодильнике при температуре -80⁰C, а

концентрацию IL-10 исследовали методом ИФА, используя тест SET-Go (eBioscience).

11. Метод ИФА.

Продукцию цитокинов в супернатантах, определяли методом ИФА. Проведение эксперимента длилось 3 дня.

В первый день в плашку ELISA (из 96 лунок) добавляли по 100 мкл раствора (48 мкл Capture antibody + 12 мл Coating Buffer). Закрывали плашку и инкубировали всю ночь при температуре 4⁰С.

На второй день плашку отмывали 5 раз Wash Buffer-ом. В каждую лунку плашки добавляли по 200 мкл раствора (4 мл assay diluent + 16 мл дистиллированной воды). Инкубировали при комнатной температуре 1 час. Далее снова отмывали Wash Buffer-ом 5 раз. После чего приготавливали разведения Standart (IL-10, IL-1 β , TNF- α либо IFN- γ) используя следующие дозы 300; 150; 75; 37,5; 18,75; 9,37; 4,68 и 2,34. Добавляли по 100 мкл каждого разведения IL-10, IL-1 β , TNF- α либо IFN- γ . А остальные лунки плашки ELISA наполняли по 100 мкл супернатантов (с цитокинами), в том числе и разных доз *L. acidophilus*. Инкубировали всю ночь при температуре 4⁰С.

На третий день плашку снова отмывали Wash Buffer-ом 5 раз. Добавляли в каждую лунку по 100 мкл detection antibody разбавленное в 1 \times Assay Diluent (2.4 мл Assay Diluent+ 9.6 мл дистиллированной воды) + 48 мкл detection antibody). Герметично закрывали плашку и инкубировали при комнатной температуре 1 час. Снова отмывали плашку Wash Buffer-ом 5 раз. Далее добавляли 100 мкл Adivin-HRP (2.4мл Assay Diluent+ 9.6 мл дистиллированной воды) + 48 мкл Adivin-HRP). Герметично закрывали плашку и инкубировали при комнатной температуре 30 минут. Удаляли надосадочную жидкость и отмывали Wash Buffer-ом, но уже не 5, а 7 раз. После чего добавляли в каждую лунку 100 мкл Substrate Solution и инкубировали плашку при комнатной температуре 15 минут. Добавляли в каждую лунку 50 мкл Stop Solution-2M H₂SO₄ (95мл дисилированной воды + 5мл H₂SO₄). И читали полученное с помощью ридера (Sanofi, France, Pasteur, версия 2.1, код PR2100).

12. Статистическая обработка данных.

Статистически данные обрабатывали методом компьютерной программы GraphPad (метод дисперсионного анализа с использованием параметрических и непараметрических методов). Результаты исследований были использованы для расчета средних значений \pm SD, а различия были определены как статистически значимые Student's t-test (P_t), paired t-test (P_p), Wilcoxon-Mann-Whitney, и Welch's test (P_w) на P \leq 0,05.

Статистический анализ результатов исследования фагоцитарной активности клеток крови при использовании цельной, свежевыделенной периферической крови проводили отдельно от анализа результатов исследования крови, предварительно обработанной вышеуказанными препаратами, так как препараты и длительная инкубация влияли на основные гематологические показатели по сравнению со свежевыделенной кровью. При статистическом анализе контрольной и опытной групп проводилась проверка вариационных рядов на нормальность распределения и однородность дисперсий (критерий Колмогорова-Смирнова, W- и F-критерий). В случаях, когда гипотеза нормальности отвергалась, использовались непараметрические критерии

Уилкоксона-Манна-Уитни (P_y). В остальных случаях расчет проводился с помощью критерия Стьюдента (P_t) и парного Т-критерия (P_p).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

1. Влияние *L. acidophilus* “Нарине” на индукцию синтеза ИЛ-1 β и ИЛ-10 и фагоцитарную активность культивируемых моноцитов человека.

Нами была исследована продукция ИЛ-1 β и ИЛ-10 под влиянием бактерий *L. acidophilus*, а также фагоцитарная активность моноцитов периферической крови здоровых доноров.

Моноциты периферической крови здоровых доноров были стимулированы разными дозами *L. acidophilus* в течение 18 часов. Продукцию ИЛ-1 β и ИЛ-10 в супернатантах, впоследствии, определяли методом ИФА.

Мы предположили, что живые бактерии *L. acidophilus* могут стимулировать продукцию про- и анти-воспалительных цитокинов моноцитами в течение короткого времени инкубации. Поэтому нами было исследовано влияние бактерии *L. acidophilus* на продукцию ИЛ-10 и ИЛ-1 β моноцитами периферической крови человека. Результаты проведенных исследований представлены на рис. 1.

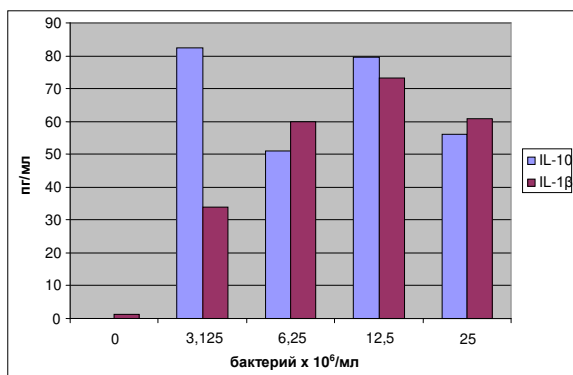


Рис.1 Влияние живых бактерий *L. acidophilus* на синтез ИЛ-1 β и ИЛ-10 моноцитами периферической крови человека.

Из представленных данных следует, что инкубация живых бактерий *L. acidophilus* с моноцитами повышает продукцию как ИЛ-1 β , так и ИЛ-10. Причем, доза бактерий 3.125×10^6 /мл с МПКЧ значительно повышает продукцию ИЛ-10 в сравнении с остальными дозами. А доза бактерий *L. acidophilus* 12.5×10^6 /мл с моноцитами здоровых доноров повышает продукцию ИЛ-1 β в сравнении с остальными дозами бактерий.

Таким образом, нами разработаны условия для изучения влияния различных доз *L. acidophilus* на синтез цитокинов. Показано, что инкубация

живых бактерий *L. acidophilus* с моноцитами повышает продукцию как IL-1 β так и IL-10.

Далее, мы исследовали также влияние *L. acidophilus* “Нарине” на фагоцитарную активность культивируемых моноцитов человека.

Моноциты периферической крови здоровых доноров были стимулированы разными дозами *L. acidophilus* в течение 18 часов. После чего клетки промывали и обрабатывали DEXTRAN-FITC для изучения фагоцитоза. Количество фагоцитирующих клеток и интенсивность процесса фагоцитоза определяли методом проточной цитофлуориметрии.

Результаты проведенных исследований показали, что такие дозы бактерий *L. acidophilus*, как от 25×10^6 /мл до 100×10^6 /мл с моноцитами периферической крови здоровых доноров стимулируют фагоцитоз, тогда как большое количество бактерий (от 200×10^6 /мл до 400×10^6 /мл) и весьма малые дозы бактерий *L. acidophilus* (от $3,125 \times 10^6$ /мл до $12,5 \times 10^6$ /мл) с МПКЧ, наоборот, подавляют этот процесс (рис. 2А , 2В, 2С и 2D).

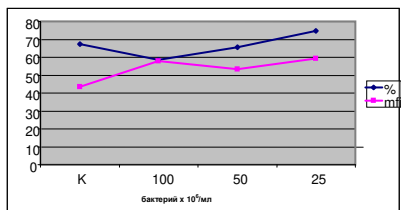
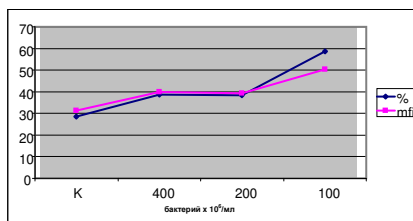


Рис.2А,2В Влияние бактерий *L. acidophilus* на интенсивность фагоцитоза и процентное содержание фагоцитирующих клеток.

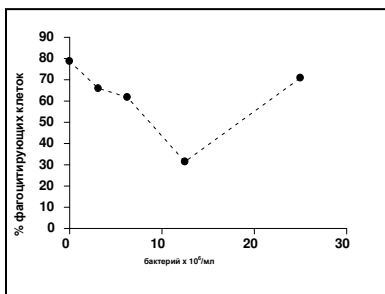
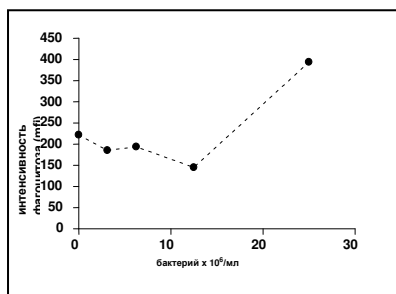


Рис.2, 2D Влияние бактерий *L. acidophilus* на интенсивность фагоцитоза и процентное содержание фагоцитирующих клеток.

Таким образом, можно сделать вывод, что дозы бактерий *L. acidophilus* 25×10^6 /мл, 50×10^6 /мл и 100×10^6 /мл с моноцитами периферической крови человека достоверно стимулируют фагоцитоз, в отличие от более низких и более высоких доз бактерий, что имеет важное значение при иммунном ответе.

2. Влияние рекомбинантных цитокинов и агонистов TLR и NLR рецепторов на индукцию синтеза IL-1 β и IL-10 культивируемыми моноцитами человека.

Мы исследовали влияние PGN, MDP, синтетического липопротеина, кроме того IL-4 на продукцию цитокинов культивируемыми моноцитами здоровых доноров.

МПКЧ были стимулированы либо PGN, либо Pam3CSK4, либо MDP в течение 3-х дней. После чего клетки промывали и обрабатывали противовоспалительными молекулами IL-4 в течение 3-х дней. Продукцию IL-1 β и IL-10 в супернатантах впоследствии определяли методом ИФА.

Как показали результаты проведенных исследований (рис.3), стимуляция NOD1 и NOD2 рецепторов с помощью PGN, статистически достоверно повысила продукцию IL-10 по сравнению с Pam3CSK4-стимулированными и нестимулированными моноцитами. NOD2 лиганд MDP значительно индуцирует продукцию IL-10, тогда как стимуляция TLR2-TLR1 рецепторов лигандом Pam3CSK4 приводит к снижению продукции синтеза IL-10.

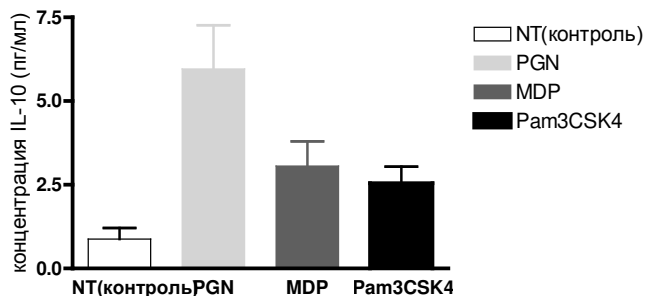


Рис.3 *Производство IL-10 нестимулированными, PGN-, -MDP- и Pam3CSK4-стимулированными моноцитами человека.*

Как видно на рис.4, синтез IL-1 β PGN, Pam3CSK4 или MDP стимулированными моноцитами значительно не отличается от синтеза IL-10. Лиганд NOD2 рецептора MDP индуцировал низкий уровень синтеза IL-1 β культивируемыми моноцитами, в то время как стимуляция NOD1 и NOD2 рецепторов с помощью PGN, повысила продукцию IL-1 β по сравнению с Pam3CSK4-стимулированными и нестимулированными моноцитами.

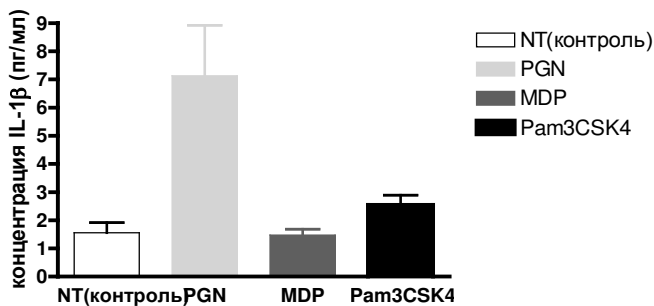


Рис.4 Продукция *IL-1β* нестимулированными, *PGN*-, *MDP*- и *Pam3CSK4*-стимулированными моноцитами.

Как видно из приведенных данных, стимуляция NOD1 и NOD2 рецепторов с помощью PGN, статистически достоверно повышает синтез как IL-10, так и продукцию IL-1β, в то время как стимуляция TLR2-TLR1 рецепторов Pam3CSK4 и NOD2 рецептора MDP приводит к снижению продукции синтеза IL-10 и IL-1β.

С целью исследования пластичности синтеза цитокинов лигандами, моноциты стимулированные PGN, Pam3CSK4 и MDP, рестимулировали рекомбинантным IL-4 в течение 3-х дней. Результаты проведенных исследований показали, что моноциты, первоначально стимулированные PGN, а в дальнейшем проинкубированные с IL-4, не продуцируют одинаковый уровень IL-1β. Такой же результат мы получили, исследуя синтез IL-1β первоначально стимулированными Pam3CSK4, а затем проинкубированными с IL-4 моноцитами (рис.5).

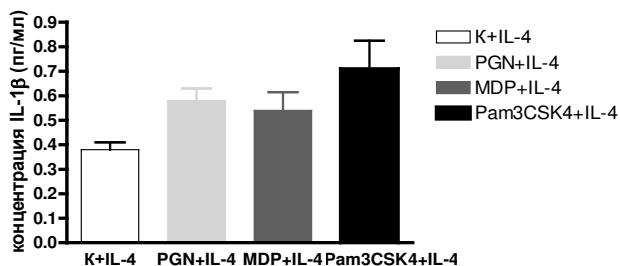


Рис.5 Синтез *IL-1β* рестимулированными *IL-4* моноцитами .

Необходимо отметить, что первоначально уровень IL-10 повысился лишь в условиях инкубации нестимулированных клеток с IL-4 (рис.6).

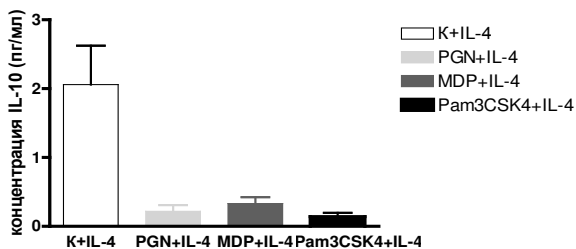


Рис.6 Синтез IL-10 рестимулированными IL-4 моноцитами.

Таким образом, сравнительное изучение действия разных агонистов на синтез IL-10 и IL-1 β показало, что стимуляция NOD1 и NOD2 рецепторов с помощью PGN повышает синтез как IL-10, так и IL-1 β по сравнению с другими агонистами. Результаты показали также, что повышается продукция IL-10 нестимулированными, а в дальнейшем IL-4 стимулируемыми моноцитами.

3. Влияние *L. acidophilus* “Нарине”, рекомбинантных цитокинов и агонистов TLR и NLR рецепторов на индукцию эндотоксиновой толерантности моноцитов человека *in vitro*.

Нами было исследовано влияние бактерий *L. acidophilus*, IL-4, LPS, PGN, MDP на индукцию эндотоксиновой толерантности моноцитов периферической крови человека.

МПКЧ были стимулированы LPS в течение 18 часов в присутствии или отсутствии TLR- и NOD-агонистов или IL-4. После чего, клетки промывали и обрабатывали другой дозой LPS в течение 4 часов. Продукцию IL-1 β , IL-10, TNF- α и IFN- γ в супернатантах, впоследствии, определяли методом ИФА. Мы обнаружили, что моноциты, стимулированные LPS в течение 18 часов, развили толерантность к LPS, что привело к снижению продукции IL-1 β , при повторной стимуляции и повторной дозой LPS.

Как представлено на рис.7, необработанные моноциты не продуцируют IL-1 β . Синтез IL-1 β наблюдается при стимуляции PGN, LPS и *L. acidophilus*. Однако, при стимуляции моноцитов повторной дозой LPS наблюдается снижение продукции IL-1 β в культурах предварительно обработанных PGN, LPS и *L. acidophilus*. Причем, моноциты, предварительно обработанные PGN и рестимулированные LPS снизили продукцию IL-1 β ($P < 0.04$) и тем самым развили эндотоксиновую толерантность (рис.7). Из чего можно предположить, что PGN и *L. acidophilus* индуцируют гетерологичную эндотоксиновую толерантность, в то время как LPS индуцирует гомологичную эндотоксиновую толерантность. А в присутствии MDP (который выборочно активировал NOD2) и IL-4 повторная эндотоксиновая стимуляция не приводит к синтезу IL-1 β , что свидетельствует о том, что MDP и IL-4 стимулируют гетерологичную эндотоксиновую толерантность.

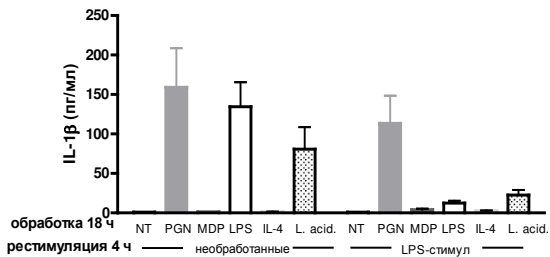


Рис.7 Продукция *IL-1β* нестимулированными, *PGN*-, *MDP*-, *LPS*-, *IL-4* и *L. acidophilus*- стимулированными моноцитами и рестимулированными *LPS* моноцитами.

Далее, мы обнаружили, что при индукции и инкубации в течение 18 часов моноцитов здоровых доноров снизилась продукция *TNF-α*, т. е. развилась эндотоксинотолерантность (рис.8). Однако, при повторной стимуляции *LPS* (на следующий день, в течение 4-х часов) моноцитов наблюдалась 25.0 кратное снижение продукции *TNF-α* ($P_w < 0.05$). Как показано на рис.8 повторная доза *LPS* приводит к более резкому развитию эндотоксинотолерантности по сравнению с остальными комбинациями.

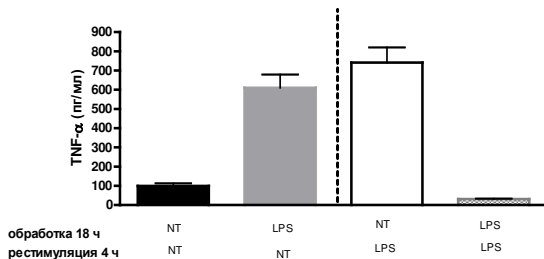


Рис.8 Продукция *TNF-α* нестимулированными и *LPS*- стимулированными моноцитами и рестимулированными *LPS* моноцитами.

Мы исследовали синтез *IL-10* моноцитами периферической крови человека, индуцированными повторной дозой *LPS* (рис.9). Мы сравнили продукцию *IL-10* нестимулированными и *LPS* стимулированными моноцитами периферической крови человека в течение 18 часов инкубации. Как видно на рис.9, продукция *IL-10* нестимулированными моноцитами выше ($P_w < 0.01$) по сравнению с *LPS* стимулированными моноцитами. Причем, нестимулированные моноциты, рестимулированные повторной дозой *LPS*, статистически повышают продукцию *IL-10* при сравнении NT+ NT с NT +LPS.

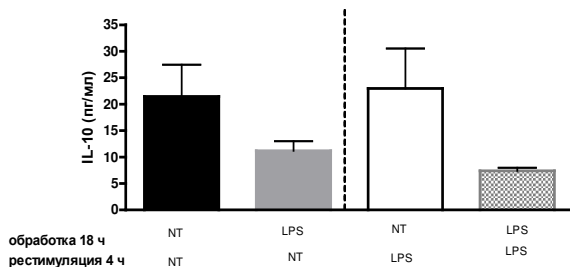


Рис.9 Продукция *IL-10* нестимулированными и *LPS*- стимулированными моноцитами и рестимулированными *LPS* моноцитами.

Далее, мы исследовали продукцию $IFN-\gamma$ путем стимуляции *LPS* моноцитов периферической крови человека (рис.10). Продукция $IFN-\gamma$ *LPS* стимулированными моноцитами увеличилась по сравнению с нестимулированными моноцитами при сравнении NT+NT с LPS+NT (рис.10) ($P_w < 0.04$), т.е. нестимулированные моноциты вызывают эндотоксинуемую толерантность. А при повторной дозе *LPS*, моноциты продуцируют статистически значимо, более высокий уровень $IFN-\gamma$, сравнивая NT+NT с NT+LPS.

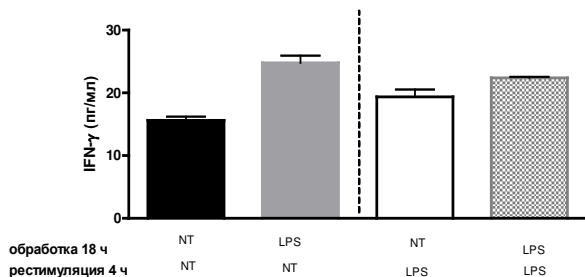


Рис.10 Продукция *IFN-γ* нестимулированными и *LPS*- стимулированными моноцитами и рестимулированными *LPS* моноцитами.

Таким образом, можно сделать вывод, что сравнительно высокая эндотоксинуемая толерантность наблюдается при изучении влияния *PGN*, *LPS* и *L. acidophilus* при повторной дозе *LPS* на синтез $IL-1\beta$. А при синтезе $TNF-\alpha$ и $IL-10$ повторная доза *LPS* также вызывает эндотоксинуемую толерантность.

4. Влияние рекомбинантных цитокинов, бактериальных липополисахаридов на продукцию IL-10 зрелыми и незрелыми культивируемыми дендритными клетками человека.

Мы исследовали продукцию IL-10 нестимулированными или LPS стимулированными и колхицином обработанными, незрелыми (iDCs) и зрелыми (mDCs) ДК, которые были получены путем культивирования моноцитов периферической крови человека в присутствии IL-4 и GM-CSF (iDCs) или IL-4, TNF- α и GM-CSF (mDCs). ДК были обработаны LPS или колхицином в течение 24 часов, а продукция IL-10 была исследована методом ИФА. Как показали результаты проведенных исследований, продукция IL-10 незрелыми ДК здоровых доноров значительно выше ($P_1 < 0.05$) чем продукция IL-10 зрелыми ДК здоровых доноров (рис.11 А, В). А продукция IL-10, стимулированными LPS и обработанными колхицином незрелыми и зрелыми ДК, незначительна. Синтез IL-10 резко понижается при воздействии LPS и колхицина незрелыми ДК. И если синтез IL-10 при воздействии LPS и колхицина незрелыми ДК почти не отличается, то разница продукции IL-10 зрелыми ДК заметна. Так, при стимуляции LPS зрелыми ДК продукция IL-10 выше по сравнению с воздействием колхицина на зрелые ДК.

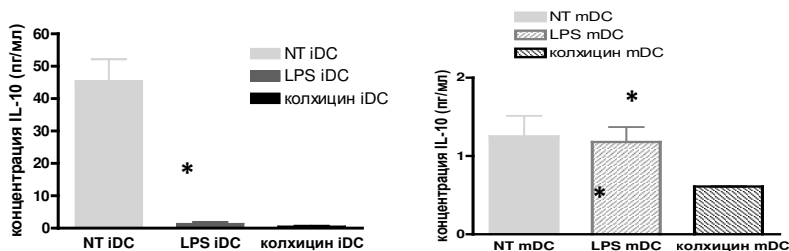


Рис.11 А,В *Производство IL-10 нестимулированными или LPS- и колхицином-обработанными незрелыми ДК (iDCs) и зрелыми ДК (mDCs) у здоровых доноров (ND). Все данные представлены в виде средних значений \pm средняя ошибка * означает, что по сравнению с необработанными клетками значение достоверности $P_1 \leq 0, 05$.*

Нами была исследована также экспрессия поверхностных маркеров CD86, CD205, CD14 и Annexin V нестимулированными, LPS и колхицином-обработанными ДК здоровых доноров (рис. 12 А, В; 13 А, В; 14, 15). Как и предполагалось, поверхностная экспрессия CD86 повысилась, а поверхностная экспрессия CD14, CD205 и Annexin V понизилась у зрелых ДК при сравнении с незрелыми ДК. ДК были обработаны LPS или колхицином в течение 24 часов, а процентное соотношение клеток CD86 и поверхностная экспрессия CD86 была исследована методом проточной цитофлюориметрии. При стимуляции LPS и воздействии колхицина на зрелые ДК поверхностная экспрессия CD86 снижается ($P_p < 0.003$ и $P_p < 0.01$, соответственно) (рис.12 А, В) при сравнении с нестимулированными зрелыми ДК. А при стимуляции LPS и воздействии колхицина на незрелые ДК по сравнению с нестимулированными незрелыми ДК поверхностная экспрессия CD86, наоборот, повышается.

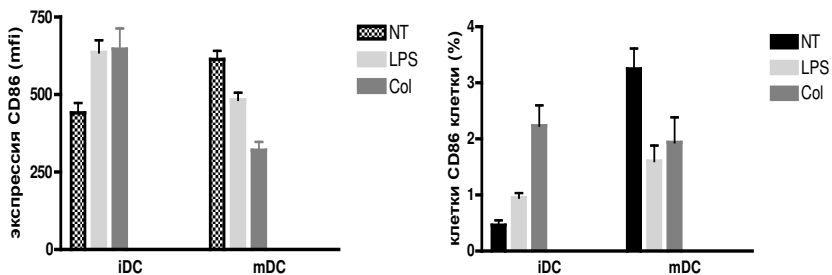


Рис.12 А, В Процентное соотношение клеток CD86 и поверхностная экспрессия CD86 нестимулированными и LPS- и колхицином-обработанными незрелыми ДК (iDCs) и зрелыми ДК (mDCs) у здоровых доноров (ND). Все данные представлены в виде средних значений \pm

ДК были обработаны LPS или колхицином в течение 24 часов, а процентное соотношение клеток CD205 и поверхностная экспрессия CD205 была исследована методом проточной цитофлюориметрии. Стимуляция LPS незрелыми ДК повысила поверхностную экспрессию CD205 у здоровых доноров ($P_1 < 0.03$) по сравнению с нестимулированными незрелыми ДК. Также у зрелых ДК, обработанных колхицином повышается поверхностная экспрессия CD205 ($P_p < 0.004$) по сравнению с нестимулированными зрелыми ДК и с LPS стимулированными зрелыми ДК (рис.13 А, В).

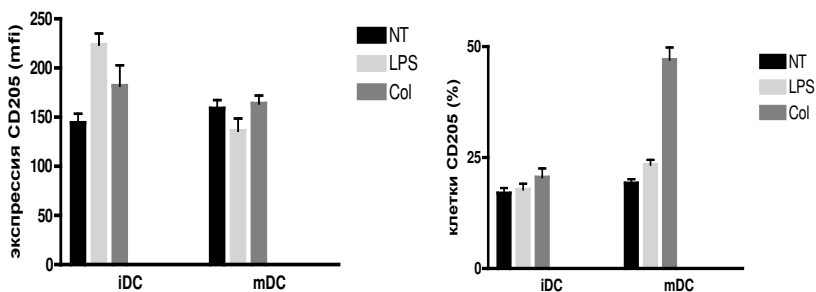


Рис.13А,В Процентное соотношение клеток CD205 и поверхностная экспрессия CD205 нестимулированными и LPS- и колхицином-обработанными незрелыми ДК (iDCs) и зрелыми ДК (mDCs) у здоровых доноров (ND). Все данные представлены в виде средних значений \pm

ДК были обработаны LPS или колхицином в течение 24 часов, а поверхностная экспрессия CD14 была исследована методом проточной цитофлюориметрии. Поверхностная экспрессия CD14 повышается при

обработывании незрелых ДК колхицином ($P_t < 0.03$) по сравнению с незрелыми ДК, стимулированными LPS (рис.14). Интересно, что при обработывании колхицином зрелых ДК, также повышается поверхностная экспрессия CD14 у здоровых доноров ($P_p < 0.005$) по сравнению со зрелыми ДК стимулированными LPS. Причем, поверхностная экспрессия CD14, при воздействии колхицина у зрелых ДК выше при сравнении с воздействием колхицина на незрелые ДК.

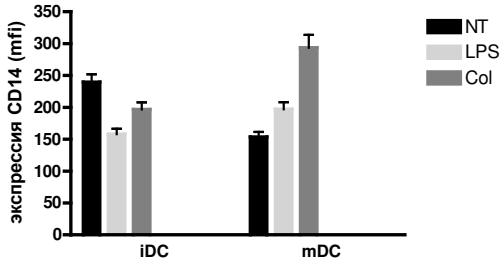


Рис.14 Поверхностная экспрессия клеток CD14 нестимулированными и LPS- и колхицином-обработанными незрелыми ДК (iDCs) и зрелыми ДК (mDCs) у здоровых доноров (ND). Все данные представлены в виде средних значений \pm

Мы также исследовали апоптоз нестимулированными, LPS-стимулированными и колхицином обработанными ДК, путем определения поверхностной экспрессии Annexin V. LPS и колхицин повышают апоптоз зрелых ДК ($P_p < 0.003$ и $P_p < 0.01$, соответственно) (рис.15) по сравнению с необработанными зрелыми ДК. А при воздействии колхицина на незрелые ДК также наблюдается повышение поверхностной экспрессии Annexin V по сравнению с нестимулированными и LPS стимулированными незрелыми ДК. Причем поверхностная экспрессия Annexin V (клеточный белок) при воздействии колхицина зрелыми ДК выше по сравнению с воздействием колхицина незрелыми ДК. Кроме того, при стимуляции LPS апоптоз зрелых ДК выше по сравнению с апоптозом незрелых ДК стимулированных LPS.

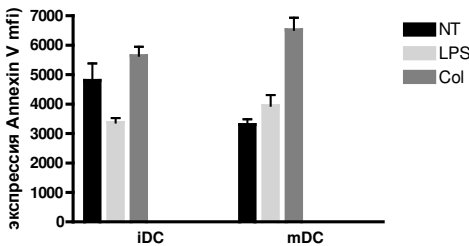


Рис.15 Поверхностная экспрессия Annexin V нестимулированными и LPS- и колхицином-обработанными незрелыми ДК (iDCs) и зрелыми ДК (mDCs) у здоровых доноров (ND). Все данные представлены в виде средних значений \pm

Таким образом, можно заключить, что продукция IL-10 незрелыми ДК здоровых доноров значительно выше по сравнению с продукцией IL-10 зрелыми ДК здоровых доноров, а при воздействии LPS и колхицина на незрелые и зрелые ДК синтез IL-10 незначителен. Также стало ясно, что поверхностная экспрессия CD86 повысилась, а поверхностная экспрессия CD14, CD205 и Annexin V понизилась у зрелых ДК по сравнению с незрелыми ДК.

ВЫВОДЫ

1. Установлено, что живые бактерии *L. acidophilus* "Нарине" при совместном культивировании с моноцитами периферической крови человека повышают продукцию про- и анти-воспалительных цитокинов IL-1 β и IL-10.
2. Выявлено, что дозы бактерий *L. acidophilus* 25 x 10⁶/мл - 100 x 10⁶/мл стимулируют фагоцитоз моноцитами периферической крови человека, в то время как бактерии *L. acidophilus* в более низких и более высоких дозах подавляют этот процесс.
3. Изучение действия разных агонистов (TLR и NLR) на синтез IL-10 и IL-1 β показало, что стимуляция NLR с помощью PGN повышает синтез как IL-10, так и IL-1 β по сравнению с другими агонистами TLR (Pam3CSK4, MDP).
4. Обнаружено усиление продукции IL-10 моноцитами, стимулированными IL-4.
5. Показано, что под действием PGN, LPS и живых бактерий *L. acidophilus* "Нарине" при повторной стимуляции LPS (1 мкг/мл) на синтез IL-1 β наблюдается более высокая эндотоксиновая толерантность по сравнению с воздействием IL-4 и MDP.
6. Выявлено, что повторная стимуляция LPS (1 мкг/мл) вызывает индукцию эндотоксиновой толерантности со снижением синтеза цитокинов TNF- α и IL-10.
7. Продукция IL-10 незрелыми ДК здоровых доноров значительно выше по сравнению с продукцией IL-10 зрелыми ДК здоровых доноров.
8. У зрелых ДК человека по сравнению с незрелыми ДК, поверхностная экспрессия CD86 повышается, а поверхностная экспрессия CD14, CD205 и Annexin V понижается.

Список работ опубликованных по теме диссертации

1. Ю.Т.Алексамян, А.Г.Сукиасян. "О возможности изучения иммуностимулирующей активности бактерий «Нарине»". Актуальные вопросы эпидемиологии инфекционных болезней. Материалы научно-практической конференции с международным участием. Ереван, 2005, стр. 24-25.
2. Ю.Т.Алексамян, Т.К.Давтян, А.Г.Сукиасян, М.В.Арутюнян, Л.Г.Акопян. "Новые аспекты использования пробиотиков". Современное состояние биотехнологии в Армении и роль МНТЦ в ее развитии. Сборник тезисов. Цахкадзор, 2008, стр. 138.

3. Ю.Т.Алексян, Т.К.Давтян, А.Г.Сукиасян. “Стимуляция продукции IL-10 культивируемыми лимфоцитами периферической крови человека под влиянием *Lactobacillus acidophilus*”. Актуальные вопросы эпидемиологии инфекционных болезней. Материалы научно-практической конференции с международным участием. Ереван, 2009, стр. 12-13.
4. А.Г.Сукиасян. “Влияние *Lactobacillus acidophilus* «Нарине» на фагоцитарную активность культивируемых моноцитов человека *in vitro*”. Актуальные вопросы эпидемиологии инфекционных болезней. Материалы научно-практической конференции с международным участием. Ереван, 2009, стр. 112-113.
5. А.Г.Сукиасян, Т.К.Давтян, Ю.Т.Алексян. Влияние *Lactobacillus acidophilus* на индукцию эндотоксиновой толерантности культивируемых моноцитов человека. Медицинская наука Армении. Ереван, 2010, 3, стр. 46-51.
6. А.Г.Сукиасян, Т.К.Давтян, Ю.Т.Алексян. Влияние IL-4 и LPS на продукцию IL-10 культивируемыми моноцитами человека. Вестник Международная академия наук экологии и безопасности жизнедеятельности. Санкт-Петербург, 2010, 15, 5, стр. 70-74.
7. А.Г.Сукиасян, Т.К.Давтян, Ю.Т.Алексян. Влияние лигандов Toll-like, NOD-like рецепторов и IL-4 на продукцию IL-10 и IL-1 β моноцитами периферической крови человека. Медицинская наука Армении. Ереван, 2011, 1, стр. 38-43.
8. А.Г.Сукиасян. Влияние IL-4 и липополисахаридов на продукцию IL-10 зрелыми и незрелыми культивируемыми дендритными клетками человека. Медицинская наука Армении. Ереван, 2011, 3, стр. 28-32.

Սուքիասյան Աննա

IL-1β և IL-10 ՄԻՆԹԵԶԻ ԻՆԴՈՒԿՑԻԱՅԻ և ՌԵԳՈՒԼՅԱՑԻԱՅԻ
ՈՒՍՈՒՄՆԱՍԻՐՈՒԹՅՈՒՆԸ ՄԱՐԴՈՒ ՊԵՐԻՖԵՐԻԿ ԱՐՅԱՆ
ԿՈՒԼՏԻՎԱՅՎՈՂ ԲԶԻԶՆԵՐԻ ՄԻՋՈՑՈՎ *LACTOBACILLUS ACIDOPHILUS*
“ՆԱՐԻՆԵ”-Ի և ԱՅԼ ԿԵՆՍԱԲԱՆԱԿԱՆ ԱԿՏԻՎ ՆՅՈՒԹԵՐԻ
ԱԶԴԵՅՈՒԹՅԱՄԲ

ԱՍՓՈՓՈԳԻՐ

Հանգուցային բառեր՝ ցիտոկիններ, IL-1β, IL-10, Toll-like
նեցեպտորներ, NOD-like նեցեպտորներ, *Lactobacillus acidophilus*, դենդրիտային
բջիջներ, մարդու պերիֆերիկ արյան մոնոցիտներ, ֆագոցիտոզ,
էնդոտոքսինային տոլերանդություն:

Իմունային համակարգը, որը գոյություն ունի ողնաշարավոր
կենդանիների մոտ, միավորում է բոլոր հյուսվածքներն ու օրգանները, որոնք
պաշտպանում են օրգանիզմը հիվանդություններից՝ իդենտիֆիկացնելով և
ոչնչացնելով պաթոգեններն և ուռուցքային բջիջները: Իմունային համակարգը
ճանաչում է բազմաթիվ հարուցիչներ՝ վիրուսներից մինչև մակաբույծները և
տարբերակում նրանց սեփական բջիջներից:

Միջբջջային փոխհարաբերությունների հիմքում կարևոր է նշել
այնպիսի ցիտոկինների դերը, ինչպիսին են IL-1β և IL-10, որոնք կարգավորում
են միջբջջային և միջհամակարգային փոխհարաբերությունները, որոշում են
բջիջների կյանքի տևողությունը, նրանց աճը, տարբերակումը, ֆունկցիոնալ
ակտիվությունը և ապոպտոզը, բացի այդ ապահովում են իմունային,
էնդոկրին և նյարդային համակարգերի համատեղ գործունեությունը, ինչպես
նորմալ պայմաններում, այնպես էլ պաթոլոգիական գործոնների
ազդեցության դեպքում:

Toll-like նեցեպտորները ճանաչում են պաթոգենների մոլեկուլային
կառուցվածքը և ակտիվացնում են օրգանիզմի պաշտպանական ուժերը:
Մակրոֆագերը ճանաչում են բակտերիաներին և հետագայում ակտիվացնում
են բնածին և ձեռքբերովի իմունային պատասխանները: Toll-like
նեցեպտորները կարևոր դեր ունեն բակտերիալ կառուցվածքի պահպանման և
բնածին իմունային ռեակցիաների կարգավորման գործում:

IL-10-ի պրոդուկցիայի ակտիվացման մոտեցումները լիարժեք
ուսումնասիրված չեն, մինչդեռ *L. acidophilus* «Նարինեն», դենդրիտային
բջիջները, կենսաբանական ակտիվ միացություններ, ինչպիսիք են

բակտերիալ պեպտիդոգլիկանները, լիպոպոլիսախարիդները, ռեկոմբինանտ ցիտոկինները IL-4 և TNF- γ , TLR և NLR ռեցեպտորները կարգավորում են ցիտոկինների սինթեզը, այդ թվում IL-10 և IL-1 β :

Գարևոր է նշել, որ կաթնաթթվային բակտերիաները ունեն մի շարք առավելություններ քիմիական պրեպարատների հետ համեմատած, քանի որ դասվում են օրգանիզմի նորմալ միկրոֆլորայի թվին և կենսաբանական ակտիվ նյութերը, որոնք սինթեզվում են կաթնաթթվային բակտերիաների կողմից խթանում են օրգանիզմի պաշտպանական ուժը և ակտիվացնում են լիմֆոցիտներին:

Դենդրիտային բջիջները ունեն անտիգենը գրավելու և T-բջիջներին ներկայացնելու յուրահատուկ մեխանիզմ, բացի այդ ակտիվացնում են բնածին իմունիտետը, կարգավորում են սպեցիֆիկ իմունային պատասխանը, որոշում են իմունային ռեակցիաների ուղղվածությունը և ակտիվությունը և այդ պատճառով նրանց ավելի հաճախ սկսել են օգտագործել տարբեր հիվանդությունների իմունոթերապիայում:

Աշխատանքը նվիրված է եղել IL-1 β և IL-10 սինթեզի ինդուկցիայի և ռեգուլյացիայի ուսումնասիրությանը մարդու դենդրիտային բջիջների և կուլտիվացվող մոնոցիտների միջոցով *L. acidophilus* “Նարինե”-ի, ցիտոկինների, TLR և NLR ռեցեպտորների ազոնիստների ազդեցությամբ:

Պարզվել է, որ կուլտիվացնելով *L. acidophilus* բակտերիաները մարդու պերիֆերիկ արյան մոնոցիտների հետ համատեղ, ակտիվացնում է ինչպես IL-1 β , այնպես էլ IL-10 սինթեզը: Toll-like և NOD-like ռեցեպտորների տարբեր ազոնիստների համեմատական ուսումնասիրությունը ցույց տվեց, որ բակտերիալ պեպտիդոգլիկանի ազդեցությամբ ակտիվանում է ինչպես IL-1 β , այնպես էլ IL-10 սինթեզը: Ընդ որում, ոչ հասուն դենդրիտային բջիջների ազդեցությամբ ի տարբերություն հասուն դենդրիտային բջիջների, նկատվում է IL-10 սինթեզի ակտիվացման բարձրացում: Իսկ պեպտիդոգլիկանով, *L. acidophilus* բակտերիաներով և լիպոպոլիսախարիդով նախապես մշակված մոնոցիտները և հետագայում վերամշակված լիպոպոլիսախարիդով, առաջացնում են էնդոտոքսինային տոլերանդություն: Նկատվել է նաև էնդոտոքսինային տոլերանդության ակտիվացում (ուսումնասիրելով IL-10 և TNF- α սինթեզը) կրկնակի անգամ լիպոպոլիսախարիդով ստիմուլացված պերիֆերիկ արյան մոնոցիտների ազդեցությամբ: Բացահայտվել է նաև IL-10 սինթեզի ակտիվացում մոնոցիտներով, որոնք ստիմուլացված են եղել IL-4-ով:

Ուսումնասիրությունների արդյունքները թույլ են տալիս գտնել մոտեցումներ IL-1 β և IL-10 սինթեզի կարգավորման *L. acidophilus* “Նարինե”-ի, TLR և NLR ռեցեպտորների ազոնիստների ազդեցությամբ, որը հնարավորություն է ընձեռնում օգտագործել վերոհիշյալ միացությունները, որպես իմունոստիմուլատորներ վարակիչ հիվանդություններ բուժման համար:

Study of induction and regulation of the synthesis of IL-1 β and IL-10 by human peripheral blood cultivated cells under the influence of *Lactobacillus acidophilus* “Narine” and other biological active substances.

SUMMARY

Key words: cytokines, IL-1 β , IL-10, Toll-like receptors, NOD-like receptors, *Lactobacillus acidophilus*, Dendritic Cells, human peripheral blood monocytes, phagocytosis, endotoxin tolerance.

The immune system is a system, that exists in vertebrate animals and unities tissues and organs that protect the body against disease by identifying and destroying tumor cells and pathogens. The immune system recognizes (detects) a wide variety of pathogens, from viruses to parasitic worms and distinguishes them from their own cells biomolecules.

In the development of cell interactions, it is important to note the role of such cytokines as IL-1B and IL-10, which regulate intercellular and intersystem interactions, determine the survival of cells, stimulation or inhibition of their growth, differentiation, functional activity and apoptosis, as well as provide coordination (consistency) of the immune, endocrine and nervous systems both in normal condition and influenced by pathological factors.

Toll-like receptors are pattern recognition receptors that recognize molecular structures on pathogens and activate host defenses. Macrophages are phagocytes that recognize bacteria and subsequently activate appropriate innate and adaptive immune responses. TLRs are essential in identifying conserved bacterial structures and in initiating and mediating innate immune responses.

The approaches of the activation of the synthesis of IL-10 are not fully studied but *L. acidophilus* “Narine”, dendritic cells and biological active substances

such as bacterial peptidoglycans, lipopolysaccharides, recombinant cytokines like IL-4 and TNF- γ , TLR and NLR receptors regulate the synthesis of cytokines as well as IL-10 and IL-1 β .

This work was devoted to the study of the induction and regulation of the synthesis of IL-1 β and IL-10 by human dendritic cells and cultivated monocytes under the influence of *L. acidophilus* “Narine”, cytokines, agonists of TLR and NLR receptors.

It should be noted, that *Lactobacilli* have several advantages to chemotherapy, because they relate to the representatives of normal microflora and complex of bioactive compounds, which are synthesized by lactobacteria, stimulate the body’s defenses and increase the activity of lymphocytes.

Dendritic cells has a unique mechanism in the capturing of antigen and presenting it to T cells, enhance innate immunity, regulate the development of specific immune response, determine the direction and activity of immune reactions, that’s why they are increasingly being used for immunotherapy of various diseases.

It was revealed that cultivated *L. acidophilus* bacteria together with human peripheral blood monocytes activate the synthesis of both IL-1 β and IL-10. Comparative researches of different agonists of Toll-like and NOD-like receptors have shown that bacterial peptidoglycan activated the synthesis of IL-10 as well as IL-1 β . Moreover it was noticed that the activity of synthesis of IL-10 increased under the influence of immature dendritic cells on the contrary to mature dendritic cells. Monocytes previously treated with peptidoglycan, *L. acidophilus* bacteria and lipopolysaccharide and thereafter retreated with lipopolysaccharide form endotoxic tolerance. It was noticed activation of endotoxic tolerance (studying the synthesis of IL-10 and TNF- α) by twice with lipopolysaccharide stimulated peripheral blood monocytes. Activation of the synthesis of IL-10 by monocytes stimulated with IL-4 was also revealed.

The results of the study allow finding approaches to the regulation of the synthesis of IL-1 β and IL-10 by means of *L. acidophilus* “Narine”, agonists of TLR and NLR receptors, which allow us using the above mentioned substances as immunostimulants for treatment of infectious diseases.