

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ОЦЕНКА МЕХАНИЗМОВ IGE-СУПРЕССИРУЮЩИХ ЭФФЕКТОВ МУРАМИЛДИПЕПТИДОВ

Центральная научно-исследовательская лаборатория  
Кубанского государственного медицинского университета,  
Россия, 350063, г. Краснодар, ул. Седина, 4. E-mail: troickaya@rambler.ru

В работе исследовано влияние ГМДП на продукцию гомоцитотропных IgE-антител у лабораторных мышей, иммунизированных аллергеном амброзии, с использованием метода пассивной кожной анафилактики. Способность липоида в составе комплексной базисной терапии снижать концентрацию общего IgE у детей с atopическим дерматитом подтверждена в экспериментах на лабораторных мышах, иммунизированных аллергеном амброзии и получавших внутрибрюшинно ГМДП. В экспериментальных исследованиях *in vitro* при инкубации мононуклеаров периферической крови детей с аллергическими IgE-опосредованными заболеваниями установлена сходная способность ГМДП снижать содержание в супернатанте IgE посредством усиления продукции интерферона- $\gamma$  и снижения интерлейкина-4. Результаты исследований делают липоид перспективным иммуномодулирующим препаратом при лечении аллергических IgE-опосредованных заболеваний.

*Ключевые слова:* МДП, ГМДП, продукция IgE, механизмы, цитокины, аллергические IgE-опосредованные заболевания.

**N. V. KOLESNIKOVA, E. A. KOKOV, L. N. KOKOVA, G. A. CHUDILOVA, I. V. NECHOTINA**

### THE EXPERIMENTAL STUDY OF MECHANISM MDP IN MODULATION OF IGE-SYNTHESIS

Central investigation laboratory Kuban state medical university,  
Russia, 350063, Krasnodar, Sedina st. 4. E-mail: troickaya@rambler.ru

In the present work was studied the influence of GMDP (in the experiments of *in vitro* and *in vivo* – on laboratory mice) on production of Ig E. Mice were immunized by ragweed allergen and influence of GMDP on the synthesis of the IgE-antibodies were detected by passive cutaneous anaphylaxis (PCA). The evaluation of the influence of GMDP on the level of common serum IGE in mice and MPC children with atop diseases was done by ELISE. GMDP – related positive clinical changes were associated with a significant decrease of IgE production by means of increase the synthesis of IFN- $\gamma$  and decrease the production of interleukin-4. Lipoide can be recommended as immunomodulator for the treatment of allergic IgE-mediated diseases.

*Key words:* MDP, GMDP, production of IgE, mechanism, cytokines, allergic IgE-mediated diseases.

### Введение

Известно, что аллергические IgE-опосредованные заболевания опосредуются активацией Т-хелперов второго порядка (Th2) с повышением продукции ими цитокинов (ИЛ-4, ИЛ-13) [11, 12], стимулирующих синтез IgE В-лимфоцитами [8]. Исходя из этого актуальность представляет поиск иммуномодуляторов, способных подавлять активность Th2 и продукцию патогенетически значимого IgE с восстановлением нормального баланса Th1/Th2-лимфоцитов при аллергических заболеваниях. В этом отношении интерес представляют так называемые мурамилдипептиды (МДП) – фрагменты пептидогликана клеточной стенки бактерий и их синтетические аналоги [7, 9], обладающие широким спектром биологической активности [2, 3, 4, 5]. Исследование механизмов действия МДП на иммунокомпетентные клетки основано на изучении иммуномодулирующих эффектов их действующего начала – глюкозаминилмурамилдипептида (ГМДП), полученного путем искусственного синтеза. Перспективность оценки способности ГМДП влиять на продукцию IgE обусловлена его известными эффектами в отношении усиления синтеза и секреции макрофагами  $\gamma$ -интерферона [6], участвующего в регуляции баланса Th1/Th2-лимфоцитов [3].

Целью настоящего исследования явилось изучение влияния ГМДП на синтез иммуноглобулина Е в экспериментах *in vivo* (на лабораторных мышах, иммунизированных аллергеном амброзии) и в системе *in vitro* (в

культуре клеток больных аллергическими IgE-опосредованными заболеваниями) с оценкой возможных механизмов эффектов ГМДП.

### Методика исследования

#### Исследование влияния ГМДП на продукцию IgE-антител мышей в системе *in vivo*

Эксперимент *in vivo* выполнен на 80 лабораторных белых мышах, которым однократно внутрибрюшинно был введен хроматографически очищенный аллерген амброзии в дозе 4 ед./мышь с оценкой уровня содержания в сыворотке специфических гомоцитотропных IgE-антител. Животные были распределены на 4 группы: 1–2-я – группы сравнения и 3–4-я – опытные группы. Третьей и четвертой группам мышей на следующие сутки после иммунизации аллергеном вводили ГМДП (4 мкг/кг массы животных), а через 10 дней (группа 3) и на 15-е сутки (группа 4) оценивали уровень гомоцитотропных IgE-антител.

Контролем служили мыши, которым не вводили ГМДП, материал от которых исследовали, соответственно, на 10-е сутки (группа 1) и на 15-е сутки (группа 2) от момента иммунизации аллергеном амброзии, а также фоновые интактные животные.

Уровень аллерген-специфических IgE-антител у мышей определяли с помощью метода пассивной кожной анафилактики по В. Levine [10]. С этой целью интактным мышам внутрикожно вводили сыворотки

крови мышей контрольных и опытных групп в разведении 1:2 в объеме 0,05 мл. Через 24 часа внутривенно этим мышам вводили разрешающую дозу аллергена амброзии (20 ед./мышь) в 0,2 мл 1%-ного раствора Эванса голубого, способного окрашивать комплекс «антиген – антитело». Через 30 минут мышей декапитуировали и измеряли размеры синего пятна на внутренней поверхности кожи животных, соответствующего уровню IgE-антител в сыворотке. Учет реакции производили с помощью планиметрически-весового метода, выражая значения показателей в мг.

#### **Изучение продукции IgE и цитокинов (ИЛ-4, $\gamma$ -ИФН) в системе *in vitro* мононуклеарами периферической крови детей с аллергическими IgE-опосредованными заболеваниями**

Объектом исследования служили мононуклеары периферической крови (МПК) 12 детей, больных аллергическими заболеваниями, а также 12 практически здоровых детей. Критерием включения в клиническую группу было наличие у больного в возрасте от 8 до 12 лет IgE-зависимого аллергического заболевания, а критериями исключения служило наличие интеркуррентных заболеваний. Использовали периферическую кровь 6 человек с диагнозом «поллиноз весенне-летне-осенний»: ринит, конъюнктивит, у 3 из них имелась астма; 6 человек с диагнозом «круглогодичный аллергический ринит», у 3 из них имел место atopический дерматит, у 4 – среднетяжелая астма с бытовой, пищевой и эпидермальной сенсibilизацией. Все дети были обследованы в стадии обострения заболевания. Уровень синтеза общего IgE при обострении в изучаемой группе составил от 150 до 450 МЕ/мл.

Диагноз и степень тяжести заболевания устанавливались в соответствии с международными рекомендациями. Для подтверждения диагноза проводились исследование общего IgE в сыворотке крови, определение функции внешнего дыхания (спирометрия, пикфлоуметрия), исключение паразитарных инвазий (методом ИФА).

МПК выделяли из гепаринизированной крови общепринятым методом на центрифуге PC-6 в градиенте плотности фиколл-пак (1077-78) («Pharmacia», Швейцария). Жизнеспособность лимфоцитов определяли по включению погибшими клетками 0,1%-ного раствора трипанового синего (Serva). Соотношение клеточных популяций в МПК в среднем составляло: лимфоцитов – около 75%, моноцитов – около 25%, нейтрофилов – не более 0,5%. После двукратной отмывки в среде 199 лейкоциты ресуспендировали в среде RPMI 1640, содержащей 2 мМ L-глутамин, 10 мМ Hepes (фирма «Serva», Германия) с добавлением 10%-ной эмбриональной телячьей сыворотки и 40 мкг/мл гентамицина. Для оценки синтеза IgE культивирование проводилось в 96 луночных планшетах при концентрации 200 тысяч клеток на лунку в объеме 150 мкл, в CO<sub>2</sub>-инкубаторе, содержащем 5% CO<sub>2</sub>, при 96%-ной влажности и 37° С в течение 6 суток, а для определения цитокинов (ИЛ-4 и  $\gamma$ -ИФН) культивирование проводили в течение 3 суток. Исследование содержания общего IgE в сыворотках и концентрации IgE, ИЛ-4 и  $\gamma$ -ИФН в супернатантах проводили иммуноферментным методом с использованием стандартных тест-наборов («Pharmacia»).

Для изучения влияния ГМДП на синтез IgE и продукцию цитокинов изначально было проведено исследование в дублях в диапазоне концентраций 10–4 М и

10–5 М. Поскольку достоверной разницы между влиянием данных концентраций не было, в дальнейшем в исследовании использовалась концентрация 10–5 М на 200 тысяч клеток МПК.

#### **Статистические методы обработки данных**

Данные представлены в виде  $M \pm m$ , где  $M$  – среднее арифметическое значение признака,  $m$  – ошибка средней арифметической величины. Подготовку данных для статистической обработки и построение графиков проводили в программе «Excell 2002» (корпорация MS, США). Статистическую обработку проводили в программе «Statistica 6.0 for Windows» (фирма «StatSoft», США).

#### **Результаты исследования**

При оценке эффектов ГМДП в отношении уровня содержания сывороточного IgE в эксперименте *in vivo* на модели немедленной аллергии у лабораторных мышей показано достоверное повышение содержания в сыворотке мышей гомоцитотропных IgE-антител на 10-е сутки после введения аллергена амброзии (1,58±0,30 против отрицательного значения в фоновой группе), тогда как на 15-е сутки после однократного введения аллергена уровень IgE-антител был несколько ниже такового (1,06±0,09), но достоверно превышал контрольный уровень (рисунок).

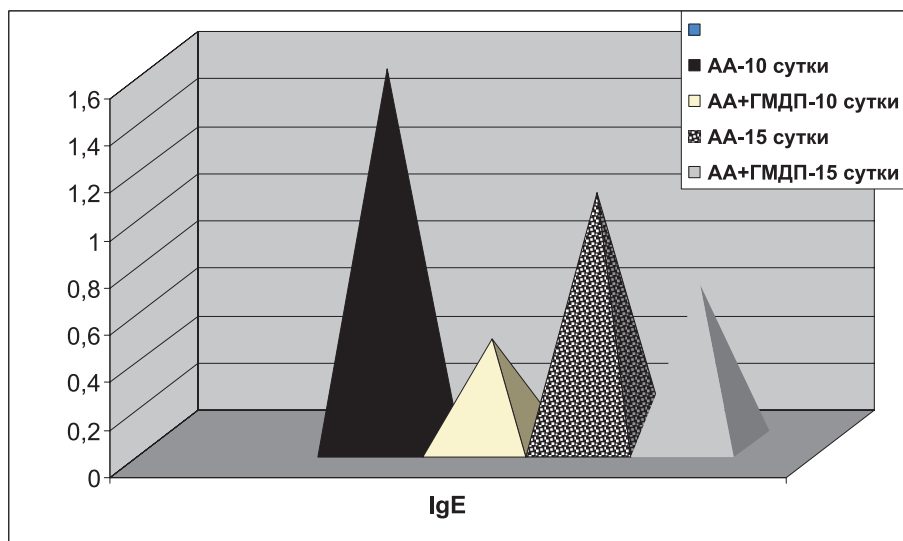
Между тем введение мышам ГМДП через 24 часа после иммунизации аллергеном вызывало на 10-е сутки (период максимума продукции IgE) достоверное снижение содержания специфических IgE-антител (0,44±0,03). Обнаруженное снижение уровня IgE сохранялось и на 15-е сутки после иммунизации аллергеном с последующим введением ГМДП (0,67±0,08 против 0,44±0,03) (рисунок).

Оценку влияния ГМДП на способность мононуклеаров периферической крови здоровых детей и больных аллергическими IgE-опосредованными заболеваниями к синтезу IgE, а также ИЛ-4 и  $\gamma$ -ИФН проводили при культивировании суспензии МПК в условиях *in vitro* по вышеописанной методике. Анализ полученных данных позволил установить, что в системе *in vitro* ГМДП ограничивает продукцию IgE мононуклеарами детей с аллергическими IgE-зависимыми заболеваниями (таблица).

При инкубации *in vitro* МПК здоровых детей с ГМДП имело место достоверное увеличение концентрации в супернатанте  $\gamma$ -ИФН с тенденцией к снижению содержания ИЛ-4 (таблица). Между тем инкубация МПК детей с аллергическими заболеваниями в присутствии ГМДП сопровождалась достоверным снижением содержания в супернатанте ИЛ-4 и увеличением концентрации  $\gamma$ -ИФН относительно исходного уровня.

#### **Заключение**

Анализ полученных результатов исследования позволяет заключить, что IgE-супрессирующие эффекты ликопида, полученные в результате ранее проведенных клинико-иммунологических исследований [1], опосредованы действием ГМДП. В настоящем исследовании получены достоверные данные о снижении продукции IgE у мышей, иммунизированных аллергеном амброзии, вызванном введением ГМДП через 24 часа после иммунизации, на 10-е и 15-е сутки наблюдения. Кроме того, определены прямые IgE-супрессирующие эффекты ГМДП в системе *in vitro* при инкубации мононуклеаров периферической крови



**Влияние ГМДП на содержание гомоцитотропных IgE-антител мышей, иммунизированных аллергеном амброзии:**

**AA-10 сутки** – содержание сывороточного IgE на 10-е сутки после иммунизации аллергеном амброзии,

**AA-15 сутки** – содержание сывороточного IgE на 15-е сутки после иммунизации аллергеном амброзии,

**AA+ГМДП-10 сутки** – содержание сывороточного IgE на 10-е сутки после иммунизации аллергеном амброзии и введения ГМДП,

**AA+ГМДП-15 сутки** – содержание сывороточного IgE на 15-е сутки после иммунизации аллергеном амброзии и введения ГМДП

**Влияние ГМДП на продукцию в системе in vitro IgE, g-ИФН, ИЛ-4 мононуклеарами периферической крови (МПК) здоровых детей и детей с аллергическими заболеваниями (M±m, p)**

Группа	Контроль (ЗФР)			Опыт (ГМДП)		
	IgE (МЕ/мл)	g-ИФН (пг/мл)	ИЛ-4 (пг/мл)	IgE (МЕ/мл)	g-ИФН (пг/мл)	ИЛ-4 (пг/мл)
МПК здоровых детей	3,12± 0,56	20,56± 1,24	7,30± 1,14	3,27± 0,59	22,93± 1,31 P<0,01	6,96± 1,91
МПК детей с аллергическими заболеваниями	9,58± 1,25	11,72± 0,11	18,35± 1,87	6,02± 0,70 P<0,01	13,91± 0,77 P<0,01	8,46± 1,85 P<0,001

детей с аллергическими IgE-опосредованными заболеваниями. Исследованиями в системе in vitro также установлено, что наблюдаемые эффекты ГМДП связаны с его способностью усиливать продукцию  $\gamma$ -ИФН и снижать синтез ИЛ-4 мононуклеарами детей с аллергическими заболеваниями, что может приводить к изменению соотношения между Th1 и Th2 в пользу Th1. Важно отметить, что ГМДП в системе in vitro вызывает повышение концентрации  $\gamma$ -ИФН в супернатанте культуральной смеси МПК здоровых детей, что обуславливает известные иммунопрофилактические эффекты ликопида [5].

Полученные результаты исследования обуславливают возможность включения иммуномодулятора ликопида в комплексную терапию детей с аллергическими IgE-опосредованными заболеваниями и дальнейшего изучения наблюдаемого эффекта ГМДП в клинике аллергических заболеваний, а также раскрывают новые стороны действия МДП в ка-

честве возможных регуляторов дифференцировки Th1- и Th2-лимфоцитов в условиях повышенной активности последних.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Колесникова Н. В., Коков Е. А., Кокова Л. Н., Чудилова Г. А., Андропова Т. М. Нарушения функциональной активности нейтрофилов у детей с atopическим дерматитом и их коррекция ликопидом // Кубанский научный медицинский вестник. – 2008. – № 3–4 (102–103) – С. 113–117.
2. Несмеянов В. А. Глюкозаминилмурамилпептиды: на пути к пониманию молекулярного механизма биологической активности // Int. J. Immunorehab. – 1998. – № 10. – С. 19–28.
3. Несмеянов В. А. Клеточные и молекулярные основы биологической активности мурамилпептидов // Тез. докл. 1-го съезда иммунологов России. – Новосибирск, 1992. – С. 328.
4. Пинегин Б. В., Хаитов Р. М. Иммуномодуляторы и некоторые аспекты их клинического применения // Клиническая медицина. – 1996. – № 8. – С. 7–12.

5. Пинегин Б. В., Андреева Т. М., Карсонова М. И. Препараты мурамилдипептидного ряда – иммунотропные средства нового поколения // Липоид в комплексном лечении и профилактике иммунодефицитных состояний. – М., 2005. – С. 19–36.

6. Хаитов Р. М. Главная мишень иммуномодулирующего действия ГМДП (липоида) // Иммунология. – 1994. – № 2. – С. 47–50.

7. Adam A. Modern concepts in immunology // Ed. C. A. Bona. – New York, 1985. – № 1. – P. 31.

8. Kapsenberg M. L., Hikens C. M., Wierenga E. A. et al. The role of antigen-presenting cells in the regulation of allergen-specific T-cell responses // Curr. Opin. Immunol. – 1998. – № 10. – P. 607–613.

9. Lederer E. Natural and synthetic immunomodulators – derived from the mycobacterial cell wall // Advances in Immunomod. Roma – Milan: Pythagora Press, 1988. – P. 9–36.

10. Levine B. B. Effect of combinations of inbred strain, antigen and antigen dose on immune responsiveness and regain production in the mouse // Int. J. Allergy. – 1970. – № 39. – P. 156.

11. Mosmann T. R., Sad S. The expanding universe of T-cell subsets: Th1, Th2 and more // Immunol. Today. – 1996. – № 17. – P. 138–146.

12. Romagnani S. TH1 and TH2 in human diseases // Clin. Immunol. Immunopath. – 1996. – № 80. – P. 225–235.

Поступила 20.12.2009

О. Г. КОМПАНИЕЦ<sup>1</sup>, В. М. ПОКРОВСКИЙ<sup>2</sup>

## МЕДИКАМЕНТОЗНАЯ БЛОКАДА АЛЬФА1-АДРЕНОРЕЦЕПТОРОВ КАК ФАКТОР СНИЖЕНИЯ РЕГУЛЯТОРНО-АДАПТИВНЫХ ВОЗМОЖНОСТЕЙ ПАЦИЕНТОВ С ГИПЕРТОНИЧЕСКОЙ БОЛЕЗНЬЮ

<sup>1</sup>Кафедра клинической фармакологии,

<sup>2</sup>кафедра нормальной физиологии Кубанского государственного медицинского университета,  
Россия, 350063, г. Краснодар, ул. Седина, 4. E-mail: Olga-Kompaniets1@yandex.ru

Лечение доксазозинем пациентов с гипертонической болезнью сопровождалось ухудшением регуляторно-адаптивных возможностей организма, что проявилось в уменьшении ширины диапазона синхронизации сердечного и дыхательного ритмов, увеличении длительности развития синхронизации на минимальной границе. Указанные изменения регистрировались как в острой фармакологической пробе, так и через четыре недели и шесть месяцев приема препарата, несмотря на достижение целевых цифр артериального давления.

**Ключевые слова:** доксазозин, сердечно-дыхательный синхронизм, регуляторно-адаптивные возможности, гипертоническая болезнь.

О. Г. КОМПАНИЕЦ<sup>1</sup>, В. М. ПОКРОВСКИЙ<sup>2</sup>

## MEDICAMENTAL BLOCKADE OF ALFA1-ADRENORECEPTORS AS A DECREASING FACTOR OF FUNCTIONAL AND ADAPTIVE ABILITIES OF PATIENTS WITH ARTERIAL HYPERTENSION

<sup>1</sup>Department of clinical pharmacology,

<sup>2</sup>department of normal physiology Kuban state medical university  
Russia, 350063, Krasnodar city, Sedina st., 4. E-mail: Olga-Kompaniets1@yandex.ru

Doksazosin has impaired functional and adaptive abilities of patients with arterial hypertension, which was revealed in decrease of cardiorespiratory synchronisation range of cardiac and respiratory rhythms, and increase of the duration of synchronisation development at the minimum limit of synchronization range. The indicated changes were observed during acute pharmacological test, after four weeks and six months of treatment, despite of the achievement of normal arterial pressure.

**Key words:** doksazosin, cardiorespiratory synchronism, functional and adaptive abilities, arterial hypertension.

### Введение

В настоящее время общепринятой оценкой эффективности медикаментозной терапии является изменение цифрового значения параметра-мишени и/или функции пораженного органа, на которое воздействует лекарственный препарат [2, 29]. В то же время известно, что функционирование организма в условиях патологии, его способность к адаптации обеспечиваются адекватным включением компенсаторных реакций [1, 5]. Поэтому в последнее десятилетие все более активно проводится поиск методов интегративной оценки адаптивных возможностей организма [6, 8, 11, 18, 19, 22, 23, 33]. Большинство ранних методов оценки адаптивного состояния основывалось на анализе показателей гемодинамики,

опросниках качества жизни, вегетативных пробах, определении индекса Кердо, индекса функциональных изменений, Лилье-Штандера и Цандера, коэффициента Хильдебранта, параметров вариабельности ритма сердца. Результаты этих методов интерпретируются преимущественно с точки зрения нарушения вегетативного баланса и характеризуют отдельные звенья вегетативной регуляции [7]. В то же время известно, что все адаптивные реакции вегетативной нервной системы являются комплексными, вовлекают в процесс несколько вегетативных функций. Максимальную интегративность в оценке регуляторно-адаптивных возможностей обеспечивает метод сердечно-дыхательного синхронизма (СДС), результирующие показатели которого оценивают