

# ИММУНОФАРМАКОЛОГИЯ

## ПОВЫШЕНИЕ ЦИТОТОКСИЧНОСТИ ЕСТЕСТВЕННЫХ КИЛЛЕРОВ КРОВИ ПАЦИЕНТОВ, СТРАДАЮЩИХ ТУБЕРКУЛЕЗОМ ЛЕГКИХ, ПОД ВЛИЯНИЕМ ПРЕПАРАТА РЕАМБЕРИН

А. И. Холамов<sup>1</sup>, В. Г. Мирзозомедова<sup>1</sup>, Д. А. Черношей<sup>1</sup>, Е. С. Лизунов<sup>2</sup>

Изучено влияние препарата реамберин на цитотоксическую активность естественных киллеров (ЕК) на экспериментальной модели в образцах крови больных туберкулезом легких и практически здоровых доноров. Моделирование острого системного воспаления осуществлялось добавлением в культуральную среду вакцины БЦЖ. Через 48 ч осуществляли выделение мононуклеаров периферической крови путем градиентного центрифугирования, ставили цитотоксические тесты с клеточной опухолью линии К-562. Выявлено стимулирующее влияние препарата реамберин на цитотоксическую активность естественных киллеров. Метаболическая коррекция оказала положительное влияние на энергетический обмен естественных киллеров крови, повысила их выживаемость и цитотоксичность.

**Ключевые слова:** естественные киллеры крови; туберкулез легких; Реамберин.

### ВВЕДЕНИЕ

Естественные киллеры (ЕК) являются представителями клеточного звена иммунитета (врожденными клеточными неспецифическими факторами системы иммунитета) и имеют важное значение в реализации гуморального ответа [2, 3].

По своей морфологии ЕК являются большими гранулярными лимфоцитами (до 15 мкм в диаметре) с рыхлым почковидным крупным ядром [6]. Их содержание в периферической крови достигает 12 – 16 % от общего числа циркулирующих клеток белой крови. По данным литературы, повышенное содержание ЕК отмечается в печени (до 50 %), лёгких (до 5 – 30 %), селезёнке (до 10 – 36 %) [4]. Установлено, что этого количества достаточно для функционирования противоопухолевой и противовирусной защиты. На поверхности ЕК имеются рецепторы особой природы, отвечающие за распознавание молекул главного комплекса гистосовместимости I класса измененных вследствие опухолевого перерождения клетки, внедрения в нее внутриклеточного паразита и др. Типичными маркерами ЕК являются низкоаффинный рецептор Fc-фрагмента IgG (CD16) и молекула клеточной адгезии CD56. ЕК способны непосредственно воздействовать на клетку-мишень синтезируемыми перфоринами и гранзимами (прямая клеточная цитотоксичность), связавшись с ее рецепторами, или же через IgG (иммуноглобулин-опосредованная клеточная цитотоксичность) [1, 5].

Особенно важна роль ЕК на начальных этапах развития противотуберкулезного иммунитета, поскольку они способны немедленно разрушать инфицированные клетки и стимулировать развитие клеточного иммунного ответа. В экспериментальных работах по изучению противотуберкулезного иммунитета на мышах было описано

повышение количества популяции ЕК в легких млекопитающих в первые 3 недели после инфицирования микобактериями. Наибольший вклад в противотуберкулезный иммунитет помимо ЕК вносят Т-хелперы, Т-киллеры.

Активность ЕК зависит от диеты, образа жизни, а также снижается при неопластических процессах. Поэтому повышение их цитотоксичности является одним из направлений исследований в иммунологии и клинической фармакологии. Вместе с тем проблеме метаболической коррекции естественной киллерной активности посвящено сравнительно мало экспериментальных исследований.

Целью экспериментального исследования являлось изучение влияния препарата реамберин на цитотоксические свойства ЕК крови практически здоровых доноров и пациентов, страдающих легочной формой туберкулеза, *in vitro*.

### МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследовали образцы крови (по 4 мл), стабилизированной гепарином (20 ЕД/мл), пациентов с туберкулезом легких (5 образцов) и практически здоровых доноров (5 образцов – контрольная группа), сопоставимых по полу (мужчины) и возрасту (24 – 25 лет). В экспериментальном исследовании использовали суспензию противотуберкулезной вакцины БЦЖ (*Bacillus Calmette-Guerin*, VCG) (предоставлена НИИ “Фтизиатрии и пульмонологии”), раствор фикола ( $c = 1,077 \text{ г/см}^3$ ); питательную среду RPMI-1640; препарат реамберин (ООО “НТФФ ПОЛИСАН”, Россия), содержащий меглюмина натрия сукцинат (1,5 % - 400 мл); 0,1 % раствор трипанового синего; опухолевую эритромиелоидную линию клеток К-562, чувствительную к воздействию ЕК (предоставлена Научно-исследовательской частью Белорусского государственного медицинского университета); изотонический раствор натрия хлорида.

Для изучения дозовой зависимости влияния препарата реамберин на цитотоксические свойства ЕК крови цельную кровь, стабилизированную гепарином (20 ЕД гепа-

<sup>1</sup> УО “Белорусский государственный медицинский университет”, 220116, Беларусь, Минск, пр. Дзержинского, 83.

<sup>2</sup> Городская клиническая больница №5 г. Минска, 220026, Беларусь, Минск, ул. Филатова, 9.

рина на 1 мл крови), культивировали с препаратом реамберин. Разведением в культуральной среде добивались создания концентрации препарата 3, 5 и 7,5 мг/мл (по меглюмина натрия сукцинату) (табл. 1).

Для создания острого системного воспаления *in vitro* в каждую из пробирок добавляли суспензию вакцины БЦЖ. При этом соотношение мононуклеаров периферической крови и микроорганизмов (*M. bovis*) составляло 1:5.

Количество мононуклеаров в крови у пациентов, страдающих туберкулезом, и здоровых доноров *in vitro* доводилось до одинакового числа (1 000 000 клеток в 1 мл). Количество добавляемых микроорганизмов было 5000000 бактерий в 1 мл.

Количество микобактерий подсчитывали с помощью нефелометра. Использовали бикарбонатную питательную среду RPMI-1640, которую добавляли в каждую из пробирок в количестве 1000 мкл. В качестве буфера использовали изотонический раствор натрия хлорида, который добавляли в необходимом количестве с целью доведения общего объема до 6000 мкл.

Культивирование проводили в течение 48 ч при температуре 36,6 °С в условиях термостата. После культивирования смесь (кровь + среда + БЦЖ + реамберин), разведенную физиологическим раствором натрия хлорида изотонического в соотношении 1:2, наслаивали на раствор фиколла. Проводили центрифугирование при комнатной температуре в течение 20 мин на центрифуге с горизонтальным ротором при 1500 об/мин. После собирали интерфазное кольцо, содержащее мононуклеарные клетки, в отдельную пробирку. Суспензию мононуклеарных клеток дважды отмывали изотоническим раствором натрия хлорида, центрифугируя по 10 мин при 1000 об/мин. Сливали супернатант и ресуспендировали клетки в 0,5 мл культуральной среды RPMI-1640. Подсчет клеток осуществляли в камере Горяева. Жизнеспособность клеток определяли с помощью 0,1 % раствора трипанового синего.

Для оценки цитотоксичности естественных киллеров крови определяли максимально переносимую концентрацию (МПК) с разведением клеток-эффекторов (опухолевые клетки эритромиелоидной линии К-562) – 1/1, 1/10 и 1/100 (абсолютное число клеток опухоли в лунке составило в среднем 40, абсолютное число мононуклеаров в лунке составило в среднем 40, 400 и 4000, соответственно). Клетки вносили в плоскодонные планшеты в различных соотношениях мишеней и эффекторов (1/1, 1/10 и 1/100). Одновременно на планшете проводили 4 серии экспериментов по 3 разведения с 3 повторами 5 образцов крови практически здоровых доноров и 5 образцов крови пациентов, страдающих туберкулезом легких. Всего на-

считывалось  $4 \times 3 \times 3 \times (5 + 5) = 360$  экспериментальных лунок.

Опухолевые клетки эритромиелоидной линии К-562 культивировали в среде RPMI-1640, содержащей 10 % инактивированной эмбриональной телячьей сыворотки, 2 мМ L-глутамин и смесь антибиотиков, при 37 °С во влажной атмосфере и 5 % CO<sub>2</sub>. Клетки пересеивали дважды в неделю, отмывали полной питательной средой RPMI-1640. Определение жизнеспособности клеток К-562 осуществляли с помощью красителя трипанового синего (она составляла более 96 %). 4-часовые цитотоксические тесты проводили в плоскодонном 60-луночном планшете Terasaki.

Среднее количество жизнеспособных (живых) и нежизнеспособных (мертвых) клеток опухоли К-562 по результатам 3 повторов каждой из 4 серий экспериментов (I – контроль, II – опыт 3 мг/мл, III – опыт 5 мг/мл, IV – опыт 7,5 мг/мл) по 3 разведения (1/1, 1/10, 1/100) контрольной и опытной группы запротокколировано и представлено в виде сводных таблиц (в связи с ограничением объема статьи сводные таблицы значений не приводятся). Подсчитано общее количество живых и мертвых опухолевых клеток К-562 до и после цитотоксического теста. Рассчитана цитотоксичность естественных киллеров каждого практически здорового донора и каждого пациента, страдающего туберкулезом легких, по формуле:

$$\text{Цитотоксичность} = \frac{\text{Мертвые клетки опухоли}}{\text{Сумма живых и мертвых клеток опухоли}} \times 100 \%$$

Проведен статистический анализ полученных результатов с помощью программы Microsoft Excel. Были рассчитаны среднее, стандартная ошибка, медиана, стандартное отклонение, минимум, максимум. Достоверность  $p \leq 0,05$ .

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Анализ полученных данных показал, что при внесении в образец крови пациента с туберкулезом легких препарата реамберин цитотоксичность естественных киллеров повышается пропорционально концентрации препарата и является максимальной в опытной серии экспериментов с концентрацией препарата 5 мг/мл при разведении 1/100 (18,2 ± 4,6) % (табл. 2). Как видно из результатов, цитотоксичность ЕК возрастала пропорционально увеличению концентрации препарата реамберин во всех разведениях. Также цитотоксичность повышалась пропорционально разведению клеток-мишеней. Это

Таблица 1. Схема проведения исследования

Опыт	Кровь, мл	Среда RPMI-1640, мл	БЦЖ – раствор, мл	Реамберин 1,5 % раствор, мл	Буфер (изотонический раствор натрия хлорида), мл
Контроль (кровь + БЦЖ)	1	1	1	-	3
Реамберин 3 мг/мл	1	1	1	1,2	1,8
Реамберин 5 мг/мл	1	1	1	2	1
Реамберин 7,5 мг/мл	1	1	1	3	-

Таблица 2. Влияние реамберина на цитотоксичность ЕК больных туберкулезом легких (тест с клетками эритромиелоидной линии К-562,  $M \pm SE$ )

Группа	Разведение клеток К-562, %		
	1/1	1/10	1/100
Контроль	4,1 ± 0,8	7,3 ± 1,5	14,2 ± 3,7
Реамберин 3 мг/мл	6,0 ± 2,1	7,9 ± 1,8	17,9 ± 4,6
Реамберин 5 мг/мл	6,2 ± 1,1	12,5 ± 3,1	18,2 ± 4,6
Реамберин 7,5 мг/мл	6,6 ± 1,4	13,1 ± 3,2	17,7 ± 4,4

**Примечание:** контрольная группа – образцы крови без реамберина.

связано с увеличением абсолютного числа ЕК в каждой из лунок при одном и том же количестве клеток опухоли.

Анализ полученных результатов показал, что при внесении к образцу крови практически здорового донора препарата реамберин цитотоксичность ЕК повышается пропорционально концентрации препарата и является максимальной в опытной серии экспериментов с концентрацией препарата 5 мг/мл при разведении 1/100 (23,6 ± 5,9) %. Сравнительный анализ средних значений цитотоксичности ЕК в крови больных туберкулезом легких (опытная группа) и практически здоровых доноров (контрольная группа) выявил, что динамика роста показателя пропорциональна концентрации реамберина (табл. 3).

Установлено, что повышение цитотоксичности ЕК в крови больных туберкулезом легких под действием реамберина в концентрации 3 мг/мл при разведениях 1/1, 1/10 и 1/100 меньше, чем в крови здоровых доноров, примерно на 2,5, 3,7 и 4,7 % соответственно ( $p \leq 0,05$ ), в концентрации 5 мг/мл при разведениях 1/1, 1/10 и 1/100 меньше, чем в крови здоровых доноров, примерно на 2,6, 3,4 и 5,4 %, соответственно ( $p \leq 0,05$ ), в концентрации 7,5 мг/мл при разведениях 1/1, 1/10 и 1/100 меньше, чем в крови здоровых доноров, примерно на 2,8, 3,3 и 3,9 %, соответственно ( $p \leq 0,05$ ).

Это может быть объяснено спецификой туберкулезно-го процесса.

## ВЫВОДЫ

1. Реамберин повышает цитотоксическую активность ЕК в образцах крови здоровых и больных легочной фор-

Таблица 3. Влияние реамберина на цитотоксичность ЕК практически здоровых доноров (тест с клетками эритромиелоидной линии К-562,  $M \pm SE$ )

Группа	Разведение, %		
	1/1	1/10	1/100
Контроль	5,5 ± 1,0	9,7 ± 1,7	18,9 ± 4,2
Реамберин 3 мг/мл	8,5 ± 2,4	11,6 ± 2,3	22,5 ± 5,1
Реамберин 5 мг/мл	8,8 ± 1,7	15,9 ± 3,7	23,6 ± 5,9
Реамберин 7,5 мг/мл	9,4 ± 1,8	16,4 ± 3,9	21,6 ± 5,3

**Примечание:** контрольная группа – образцы крови без реамберина.

мой туберкулеза молодых мужчин в среднем на 2,8 и 2,1 % ( $p \leq 0,05$ ) при концентрации 3 мг/мл, на 4,7 и 3,8 % ( $p \leq 0,05$ ) при концентрации 5 мг/мл, на 4,4 и 3,9 % ( $p \leq 0,05$ ) при концентрации 7,5 мг/мл, соответственно.

2. Цитотоксичность ЕК зависит от концентрации препарата реамберин. Оптимальная концентрация препарата – 5 мг/мл.

3. Средние значения цитотоксичности ЕК у больных туберкулезом легких ниже в среднем на 0,7 % ( $p \leq 0,05$ ) при концентрации препарата 3 мг/мл, на 0,9 % ( $p \leq 0,05$ ) при концентрации препарата 5 мг/мл, на 0,5 % ( $p \leq 0,05$ ) при концентрации препарата 7,5 мг/мл, чем в образцах крови здоровых доноров (контрольная группа).

## ЛИТЕРАТУРА

1. А. М. Земсков, *Клиническая иммунология*, ГЭОТАР-Медиа, Москва (2008).
2. Дж. Клаус, *Лимфоциты: методы*, Мир, Москва (1990).
3. Л. В. Ковальчук, *Иммунология*, ГЭОТАР-Медиа, Москва (2010).
4. С. А. Павлович, *Микробиология с вирусологией и иммунологией*, Вышэйшая школа, Минск (2008).
5. Michael T. Lotze, *Natural Killer Cells: Basic Science and Clinical Application*, Thomson, Elsevier, London (2010).
6. М. Н. Росс, *Histology: A Text and Atlas*, Wolters Kluwer, Baltimore (2006), pp. 284 – 285.
7. Реамберин инструкция [Электронный ресурс]. Режим доступа: <http://www.polysan.ru/produkti-siya/ream-instruktsiya.htm>

Поступила 31.07.15

## THE USE OF "REAMBERIN" AS BIOLOGICAL RESPONSE MODIFIER TO INCREASE THE NATURAL KILLER CELLS' CYTOTOXICITY IN PATIENTS WITH LUNG TUBERCULOSIS

A. I. Kholamov<sup>1</sup>, V. G. Mirzomogomedova<sup>1</sup>, D. A. Chernoshey<sup>1</sup>, and E. S. Lizunov<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Belarus State Medical University, prosp. Dzerzhinskogo 83, Minsk, 220116 Belarus Republic

<sup>2</sup> Municipal Clinical Hospital No. 5, ul. Filatova 9, Minsk, 220026 Belarus Republic

The effect of the drug "Reamberin" cytotoxic activity of natural killer cells (EC) in an experimental model in the blood samples of patients with pulmonary tuberculosis and healthy donors. Simulation acute systemic inflammation by adding to the culture medium of BCG. After 48 hours, selection was performed mononuclear peripheral blood by gradient centrifugation tests set cytotoxic tumor cell line K-562. Revealed the stimulating effect of the drug "Reamberin" cytotoxic activity of natural killer cells. Metabolic Correction has had a positive impact on the energy metabolism of blood natural killer cells, to increase their survival and cytotoxicity.

**Key words:** blood natural killer cells; lung tuberculosis; "Reamberin".