

УДК: 612.017.1:612.649.011.87:615.014.41

РОЛЬ МОНОЦИТАРНО-ФАГОЦИТАРНОЙ СИСТЕМЫ В ФОРМИРОВАНИИ ПРОТИВОВИРУСНОЙ РЕЗИСТЕНТНОСТИ У МЫШЕЙ ПОСЛЕ ПРЕДВАРИТЕЛЬНОГО ВВЕДЕНИЯ КРИОКОНСЕРВИРОВАННОЙ КОРДОВОЙ КРОВИ

Кожина О. Ю., Останкова Л. В., Останков М. В.,
Бондарович Н. А., Гольцев А. Н.

Институт проблем криобиологии и
криомедицины НАН Украины

Острые респираторные вирусные инфекции (ОРВИ) являются наиболее распространенными среди всех инфекционных заболеваний. Почти 90 % населения как минимум 1 раз в год болеют одной из форм ОРВИ [1, 2]. Из всех известных вирусов, вызывающих инфекционные заболевания верхних дыхательных путей, самым распространенным является вирус гриппа [3]. Он обладает уникальной способностью к изменчивости, обусловленной реассортацией генов в различных комбинациях, что может привести к возникновению нового шифт-варианта, к которому иммунитет у населения отсутствует [4]. Предсказать, какими свойствами будет обладать вирус, который вызовет очередную эпидемию, удается не всегда, что затрудняет своевременный выпуск эффективных лекарственных препаратов, вакцин [3].

Поэтому для своевременной профилактики гриппа актуальным является поиск биологически активных веществ, способных активизировать неспецифический иммунный ответ. Одним из них может быть криоконсервированный лейкоконцентрат кордовой крови человека (кЛККЧ). В ИПКиК НАН Украины разработаны и получены патенты на криоконсервирование ЛККЧ [5], представляющего собой взвесь ядросодержащих клеток в аутоплазме, полученных седиментационным методом и замороженных без применения традиционных криопротекторов, что позволяет использовать их без отмывания в клинической практике. При изучении свойств кЛККЧ было показано его противовирусное воздействие на вирус гриппа А/Виктория в экспериментах *in vitro* и *in vivo* [6, 7].

Входными воротами для респираторных вирусов, в том числе и гриппа, служит эпителий дыхательных путей, являющийся главной мишенью для патогенов [3]. Поэтому перспективным направлением является разработка средств, не только создающих иммунологический барьер на слизистых оболочках после интраназального введения, но и повышающих активность факторов неспецифической защиты.

Известно, что одним из механизмов неспецифической защиты от внедряющихся в организм вирусов является активация клеток моноцитарно-фагоцитарной системы (МФС) [8]. Показано, что ин-эритроцитов в градиенте плотности высокомолекулярного декстрана (полиглокин, «Юриа-

фицированная клетка-мишень повреждается при поступлении в неё содержимого цитоплазматических гранул клеток МФС в виде протеолитических и липолитических ферментов, фактора некроза опухоли и других молекул [8, 9, 10], что, в конечном итоге, приводит к элиминации патогена из организма. Клетки МФС реаранжируют специфический ответ через секрецию провоспалительных цитокинов, инициирующих пролиферацию и дифференцировку Т-лимфоцитов, которые благодаря кооперативному взаимодействию с антигенпрезентирующими клетками, процессинга и представления антигена образуют клон специфических Т-лимфоцитов. Кроме того, цитокины этого же паттерна вызывают существенную перестройку естественных киллеров (ЕК), в результате чего значительно возрастает их цитолитическая активность [9, 11, 12].

На основании вышесказанного, целью данной работы было оценить влияние превентивного введения кЛККЧ и его компонентов на функциональную активность клеток МФС в условиях индуцированной вирусной инфекции (гриппа).

Материалы и методы

Эксперименты были проведены на мышах линии Balb/C массой 18-20 г, 2- и 8-ми месячного возраста в соответствии с «Общими принципами экспериментов на животных», одобренными II Национальным конгрессом по биоэтике (Киев, 2003, Украина) [13] и согласованными с положениями «Европейской Конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других научных целей» (Страсбург, 1986).

Мыши были разделены на 6 опытных групп (n=20), которым в возрасте 2-х месяцев интраназально вводили: 1 – кЛККЧ 0,05мл ($6 \pm 2 \times 10^5$ клеток/мышь); 2 - плазму кЛККЧ 0,05мл; 3 - ЯСК кЛККЧ 0,05мл ($6 \pm 2 \times 10^5$ клеток/мышь); 4 - вирус гриппа в дозе LD_{25/10} (иммунизированные животные); 5 – лаферобион («Киевмедпрепарат ОАО», Украина) 14МЕ 5 раз в день в течение 3 дней; 6 – физиологический раствор 0,05мл (0,9% NaCl, «Юриа-фарма», Украина).

Через 6 месяцев после введения указанных субстратов животных заражали вирусом гриппа в дозе LD_{100/10}.

Контролем были интактные (группа 7) и незараженные животные опытных групп 1-6. Вирус гриппа (штамм А/Виктория (H₃N₂)) был предоставлен Ленинградским институтом гриппа РАМН, прошёл 6 пассажей на белых мышах и 2 пассажа на куриных эмбрионах. Титр гемагглютининов инфицированной аллантоисной жидкости соответствовал 1:512, инфекционный титр – 10⁴ LD_{50/10}.

Кордовую кровь получали от здоровых роже-ниц после подписания ими добровольного информированного согласия. Лейкоконцентрат из нее (ЛККЧ) готовили путём пассивной седиментации

фарм», Украина). Криоконсервирование ЛККЧ (кЛККЧ) проводили в аутологичной плазме без до-

бавления традиционных криопротекторов по двух-этапной программе [5] на программном замораживателе УОП-6 производства СКТБ с ОП ИПКиК НАН Украины. Размораживание образцов осуществляли на водяной бане при температуре 40-41°C [14]. Плазму из кЛККЧ получали после его размораживания и центрифугирования при 1500 об/мин при 20°C в течение 15 мин. Надосадок отбирали микропипеткой и пропускали через миллипорный фильтр (Carrigtwohill, Ireland). Ядродержащие клетки (ЯСК) выделяли из кЛККЧ путём двукратного центрифугирования при 1000 об/мин при 20°C в течение 10 мин. и отмывания стерильным рингер-фосфатным буфером (РФБ). ЯСК перед введением животному ресуспендировали в 2,0 мл стерильного РФБ. Стерильность ЛККЧ и отсутствие вирусной контаминации проверяли согласно методических рекомендаций [15].

Для оценки фагоцитарной активности клетки МФС получали из перитонеальной полости (ПП) мышей после введения в нее 5,0 мл охлаждённого до 4°C раствора Хэнкса («ИМНЭ», Россия) и кратковременного массирования передней брюшной стенки. Одноразовым стерильным шприцем с иглой 0,8x44мм, предварительно промытого гепарином, извлекали экссудат, центрифугировали его при 1000 об/мин. при 20°C в течение 10 мин. Надосадочную жидкость удаляли, осадок ресуспендировали в 1 мл раствора Хэнкса [8]. Количество клеток ПП подсчитывали в камере Горяева [16]. Для оценки

Результаты и обсуждение

Клетки МФС, обладая мощным цитотоксическим потенциалом, исключительной реактивностью и высокой мобилизационной готовностью, выступают в первой линии эффекторных механизмов иммунологического гомеостаза как фактор неспецифической защиты [8, 18]. Они способны представлять на своей поверхности антиген в комплексе с молекулами гистосовместимости, что определяет центральную позицию мононуклеарных фагоцитов в механизме формирования приобретенного иммуни-

фагоцитарной активности 0,5 мл клеток МФС ПП инкубировали с 0,1мл суточной убитой нагреванием культурой *Staphylococcus aureus* (1 млрд. кокков в 1,0 мл) в термостате при 37°C в течение 1 часа. Препараты окрашивали азур-II-эозином по Романовскому [8], микроскопию осуществляли с помощью светового микроскопа ЛОМО окуляр x10; объектив x10, 40, 90 (масляная иммерсия). Оценивали фагоцитарный индекс (ФИ), фагоцитарное число (ФЧ), абсолютный показатель фагоцитарной активности (АПФА) моноцитов и макрофагов по методике [17] до инфицирования и на 7-е и 14-е сутки развития вирусной инфекции.

Экспрессию молекул CD11b (Mac-1) определяли на клетках ПП методом проточной цитофлуориметрии (FACS Calibur (BD, США)) с использованием моноклональных антител FITC anti-mouse CD11b с изотипом Rat IgG2b (BD Biosciences, США) в соответствии с рекомендациями фирмы-производителя. Статистический учет данных, полученных после цитофлуориметрического анализа, осуществляли с помощью программы WinMDI 2.8 (готовый стандартный пакет программного обеспечения).

Статистическую обработку полученных результатов проводили по методу Стьюдента с учетом коэффициента Фишера.

По существу, ни одно из проявлений приобретенного иммунитета не воспроизводится в полном объеме без участия клеток МФС [8, 9, 11, 12].

Полученные результаты свидетельствуют о том, что введение кЛККЧ и его компонентов не влияло на фагоцитарную активность моноцитов у мышей 1-3 групп и через 6 месяцев они не отличались от показателей интактного контроля (табл.1, рис.1). У мышей группы 2 и 3 показатели ФИ и ФЧ достоверно не отличались от контроля, а АПФА возрос на 68% и 62% соответственно (табл.2, рис.2).

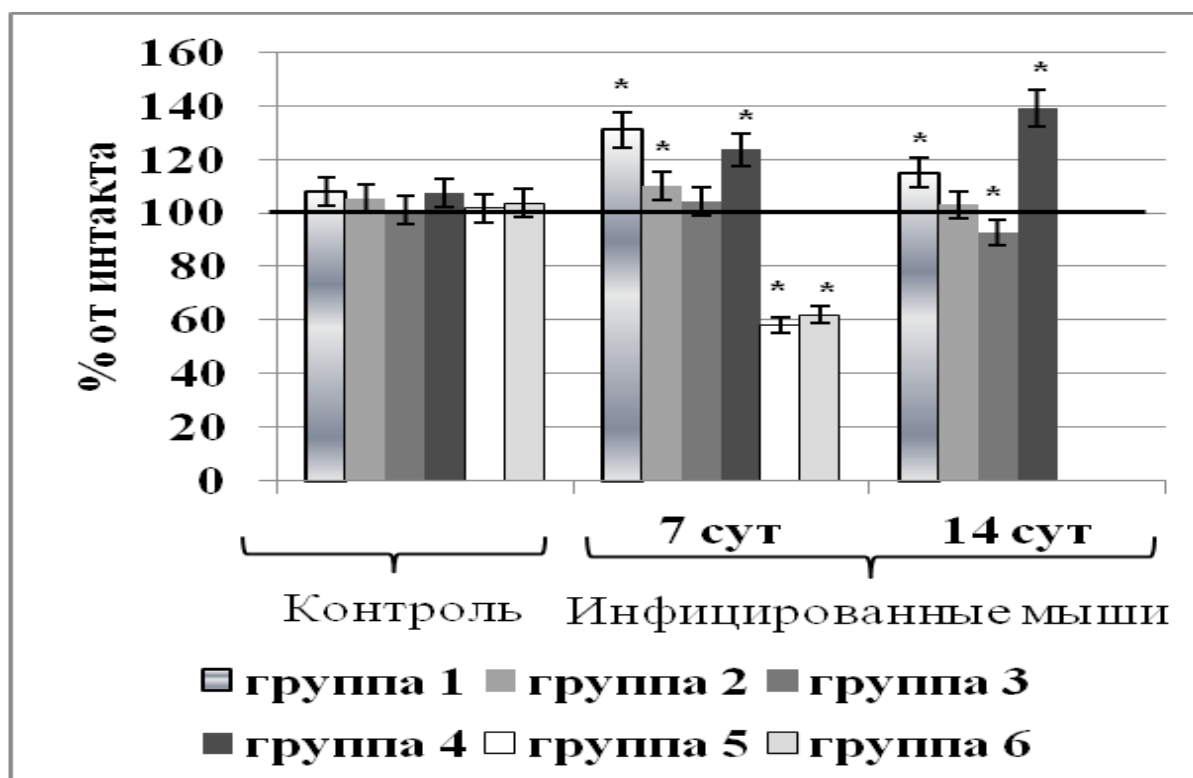


Рис.1. Абсолютный показатель фагоцитарной активности моноцитов ПП у мышей до и после инфицирования вирусом гриппа. За 100% от контроля приняты показатели интактных животных. * - различия достовернозначимые по сравнению с интактным контролем ($p < 0,05$).

Таблица 1. Показатели фагоцитарной активности моноцитов ПП у мышей до и после их инфицирования вирусом гриппа.

	Показатели активности моноцитов ПП	Неинфицированные мыши (контроль)	Инфицированные мыши (сутки)	
			7 сутки	14 сутки
Группа 1	ФИ, %	70,2±4,9	81,2±5,6 ^{*#}	72,7±5,1 [#]
	ФЧ, абс.ед.	5,4±0,38	7,3±0,51 ^{*#}	8,2±0,57 ^{*#}
	АЧ, •10 ³ /мкл	0,96±0,06	1,01±0,07 [#]	0,99±0,07 [#]
Группа 2	ФИ, %	68,7±4,8	69,3±4,9 [#]	64,1±4,48 [#]
	ФЧ, абс.ед.	5,1±0,35	6,2±0,43 ^{*#}	5,7±0,34 [#]
	АЧ, •10 ³ /мкл	0,95±0,06	0,99±0,07 [#]	1,0±0,068 [#]
Группа 3	ФИ, %	68,3±4,8	68,1±4,7 [#]	63,6±4,45 [#]
	ФЧ, абс.ед.	4,8±0,33	5,6±0,39 [#]	5,1±0,35 [#]
	АЧ, •10 ³ /мкл	0,92±0,06	0,96±0,06 [#]	0,91±0,05 [#]
Группа 4	ФИ, %	70,7±4,9	78,4±5,5 ^{*#}	76,6±5,3 ^{*#}
	ФЧ, абс.ед.	5,5±0,38	6,4±0,45 ^{*#}	6,3±0,44 ^{*#}
	АЧ, •10 ³ /мкл	0,95±0,06	0,98±0,07 [#]	1,14±0,08 ^{*#}
Группа 5	ФИ, %	66,3±4,6	56,8±3,4 [*]	-
	ФЧ, абс.ед.	5,14±0,36	3,5±0,24 [*]	-
	АЧ, •10 ³ /мкл	0,95±0,06	0,68±0,05 [*]	-
Группа 6	ФИ, %	68,4±4,8	55,4±3,9 [*]	-
	ФЧ, абс.ед.	5,2±0,36	3,2±0,22 [*]	-
	АЧ, •10 ³ /мкл	0,95±0,06	0,65±0,04 [*]	-
Группа 7 (интактный контроль)	ФИ, %	67,7±4,8	-	-
	ФЧ, абс.ед.	5,1±0,36	-	-
	АЧ, •10 ³ /мкл	0,92±0,07	-	-

Примечание: * - статистически достоверные различия по сравнению с интактным контролем; # - статистически достоверные различия по сравнению с группой 6 на 7-е сутки после инфицирования вирусом гриппа ($p < 0,05$).

При исследовании фагоцитарной активности макрофагов наблюдали повышение ФИ на 13%, ФЧ на 29%, а АПФА увеличился в 2 раза у мышей группы 1 (табл. 2, рис.2).

Таблица 2. Показатели фагоцитарной активности макрофагов ПП у мышей до и после их инфицирования вирусом гриппа.

	Показатели активности макрофагов ПП	Неинфицированные мыши (контроль)	Инфицированные мыши (сутки)	
			7 сутки	14 сутки
Группа 1	ФИ, %	94,1±6,5*	96±6,7*	93,5±6,5*
	ФЧ, абс.ед.	7,5±0,5*	7,3±0,5*#	7,1±0,4*
	АЧ, *10 ³ /мкл	1,83±0,12*	1,9±0,13*#	1,86±0,13*
Группа 2	ФИ, %	82,8±5,7	86,2±6,0*	71,6±5,0
	ФЧ, абс.ед.	5,9±0,4	4,3±0,3*#	4,9±0,34*
	АЧ, *10 ³ /мкл	1,76±0,12*	1,67±0,11*	1,46±0,1*
Группа 3	ФИ, %	83,1±5,8	84,6±5,9	73,3±5,1
	ФЧ, абс.ед.	5,7±0,4	4,5±0,31*	3,3±0,23*
	АЧ, *10 ³ /мкл	1,69±0,12*	1,44±0,1*	1,32±0,09*
Группа 4	ФИ, %	81,5±5,7	88,7±6,2	85,7±6,0
	ФЧ, абс.ед.	5,5±0,38	6,8±0,47*	6,5±0,45*
	АЧ, *10 ³ /мкл	1,05±0,07	1,34±0,09*	1,45±0,1*
Группа 5	ФИ, %	81,7±5,7	85,3±6,0	-
	ФЧ, абс.ед.	5,3±0,37	6,5±0,45	-
	АЧ, *10 ³ /мкл	1,15±0,08	1,29±0,09*	-
Группа 6	ФИ, %	80,1±5,6	85,6±5,99	-
	ФЧ, абс.ед.	5,4±0,38	6,3±0,44	-
	АЧ, *10 ³ /мкл	1,08±0,07	1,36±0,09*	-
Группа 7 (интактный контроль)	ФИ, %	79,3±5,5	-	-
	ФЧ, абс.ед.	5,2±0,37	-	-
	АЧ, *10 ³ /мкл	1,1±0,08	-	-

Примечание: * - статистически достоверные различия по сравнению с интактным контролем; # - статистически достоверные различия по сравнению с группой 6 на 7-е сутки после инфицирования вирусом гриппа ($p < 0,05$).

У мышей групп 4-6 показатели фагоцитарной активности моноцитов и макрофагов достоверно не отличались от уровня интактного контроля (табл. 1, 2, рис. 1, 2).

руют функциональное состояние макрофагов, которые при инфицировании животного вирусом гриппа находятся в функционально более активном состоянии, чем у интактных животных.

На основании полученных данных можно заключить, что КЛККЧ и его компоненты модифици-

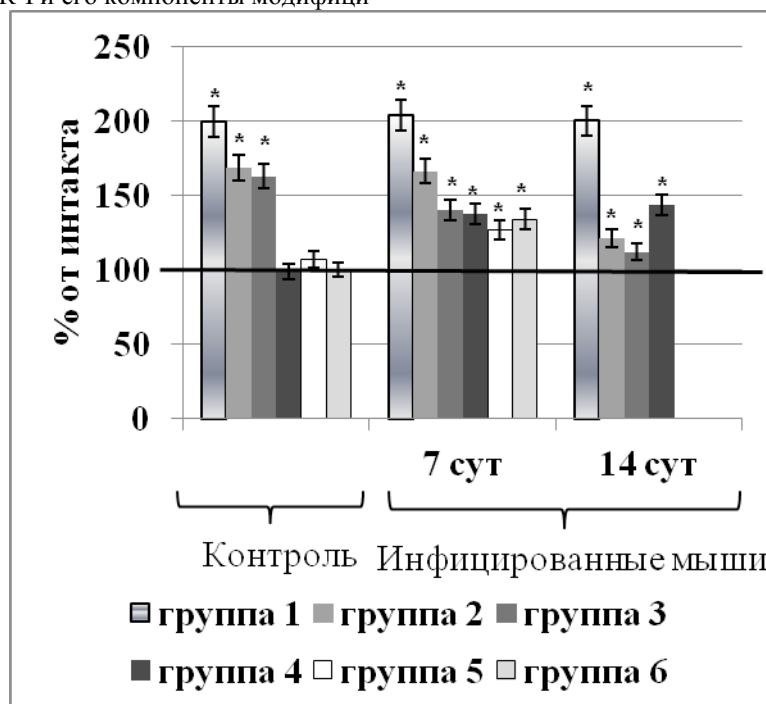


Рис.2. Абсолютный показатель фагоцитарной активности макрофагов ПП у мышей до и после инфицирования вирусом гриппа. За 100% от интакта приняты показатели интактных животных. * - различия достовернозначимые по сравнению с интактным контролем ($p < 0,05$).

На 7-е сутки после инфицирования вирусом гриппа у мышей группы 1-3 общее количество моноцитов в ПП достоверно не отличалось от исходного уровня и интактного контроля (табл. 1). При этом в группе 1 ФИ моноцитов и их ФЧ возрастало к 7-м суткам (на 21% и 57% соответственно), что

суммарно проявлялось в повышении АПФА моноцитов на 31% (рис. 1). У мышей группы 2 и 3 ФИ достоверно не изменялся относительно уровня интакта, ФЧ незначительно возросло (табл. 1). АПФА моноцитов у мышей группы 2 и 3 достоверно не отличался от уровня интактного контроля (рис. 1).

На 14-е сутки после инфицирования у мышей группы 1-3 общее количество моноцитов в ПП достоверно не отличалось от исходного уровня и интактного контроля (табл.1). У мышей группы 1 на 14-е сутки снижался ФИ, а ФЧ повысилось, что отражалось на показателях АПФА моноцитов, который повысился на 15% по сравнению с контролем (рис.1). Фагоцитарная активность моноцитов в ПП у мышей группы 2 и 3 была менее выраженной, в этот период наблюдали снижение показателей ФИ и ФЧ. При этом АПФА достоверно не отличался от интактного контроля (табл.1, рис.1).

При анализе показателей фагоцитарной активности макрофагов у мышей группы 1 на 7-е сутки после заражения вирусом гриппа было обнаружено, что концентрация макрофагов в ПП практически не изменялась относительно исходных значений и превышала уровень интактного контроля на 76%; показатели ФИ и ФЧ превышали уровень интактного контроля (на 18% и 38% соответственно) (табл.2). Интегральный показатель активности АПФА макрофагов в этой группе животных в 2 раза превышал уровень интактного контроля (рис. 2). У мышей группы 2 и 3 в этот период наблюдения содержание макрофагов в ПП достоверно снижалось относительно интакта (табл. 2), незначительно повышался ФИ, а ФЧ снижалось. АПФА макрофагов повышалось, однако, в меньшей степени, чем в группе 1 (рис. 2).

На 14-е сутки после инфицирования у мышей группы 1 количество макрофагов в ПП экссудате превышало на 35% интактный контроль и не отличалось от исходных показателей (табл. 2); показатели ФЧ на 16% и ФИ на 22% превышали уровень интактного контроля (табл.2). АПФА макрофагов у мышей группы 1 в 2 раза превышал уровень контроля (рис. 2).

У животных группы 2 и 3 отмечали снижение количества макрофагов к 14-м на 20% и 28% соответственно относительно исходного уровня до инфицирования, но оставались выше показателей интакта (табл. 2), также наблюдали снижение ФИ на 11% в группе 2, а в группе 3 – на 9%, ФЧ снизилось относительно контроля на 15% и 43% соответственно. Показатель активности АПФА в группе 2 и 3 постепенно снижался с 7-х к 14-м суткам (рис. 2).

У животных группы 4 после инфицирования наблюдали повышение ФИ и ФЧ моноцитов и макрофагов к 7-м суткам, которые достоверно не изменялись и к 14-м (табл. 1, 2). В то же время к 14-м суткам показатель АПФА моноцитов увеличивался на 43%, а макрофагов – на 37% за счёт увеличения количества фагоцитов (рис. 1, 2).

У мышей группы 5 и 6 на 7-е сутки после инфицирования вирусом гриппа наблюдали ингибцию фагоцитарной активности моноцитов. Отмечали как уменьшение абсолютного количества моноцитов в ПП, так и снижение ФИ на 20%, ФЧ – на 37%, а АПФА почти в 2 раза по сравнению с интактным контролем (рис.1, табл.1). Среди макрофагов на 7-е сутки наблюдали незначительное повышение ФИ на 6%, ФЧ - на 16%, АПФА - на 34% по сравнению с контролем (табл. 2; рис.2).

Известно, что мембранные гликопротеиды, относящиеся к семейству интегринов, играют важную роль в осуществлении миграции макрофагов и реализации одной из основных их функций – фагоцитарной активности [19]. Показано, что β_2 -интегрины (CD11/CD18) и их лиганды принимают участие во взаимодействии бронхоальвеолярных клеток [4]. Их количество на мембране альвеолярных макрофагов, например, варьирует при разных патологиях. Нестерова И.В. и соавт. [20] считают, что активация Fc-опосредованной цитотоксичности возможна только после активации рецептора адгезии CD11b, который является одновременно и рецептором адгезии комплемента, связывающего C3 компонент комплемента.

При исследовании концентрации CD11b⁺ клеток в ПП установлено, что у мышей групп 1-3 через 6 месяцев после введения КЛККЧ и его компонентов отмечали увеличение их содержания в 3 раза по сравнению с интактным контролем (рис. 3А). Однако их суммарная интенсивность флюоресценции (СИФ) не отличалась от показателей у интактного контроля (рис. 3Б). На 7-е сутки после инфицирования вирусом гриппа у мышей группы 1 наблюдали снижение количества CD11b⁺ клеток на 34% относительно исходного уровня (рис. 3А). В то же время СИФ было в 2,5-3 раза выше интактного контроля как на 7-е так и 14-е сутки (рис. 3Б). Такие изменения в показателях можно объяснить участием клеток МФС ПП мышей данной группы в инфекционном процессе, активацией и миграцией их в очаг воспаления. У животных группы 2 и 3 после инфицирования вирусом гриппа на 7-е сутки отмечали увеличение количества CD11b⁺ клеток при незначительном изменении СИФ.

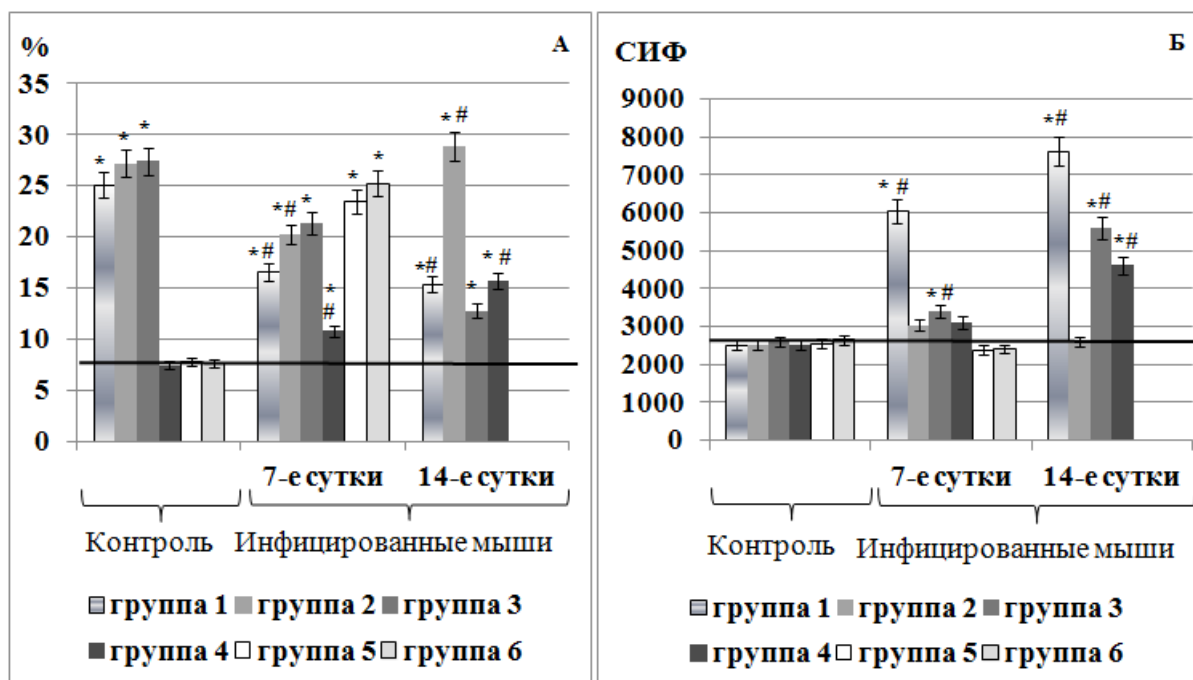


Рис. 3. Уровень экспрессии маркера CD11b (А) и СИФ (Б) клеток ПП у мышей до и после инфицирования вирусом гриппа. * - различия достовернозначимые по сравнению с интактным контролем, # - с животными группы 6 на 7-е сутки после инфицирования гриппом ($p < 0,05$).

У мышей группы 2 на 14-е сутки продолжала нарастать экспрессия CD11b, а показатель СИФ не отличался от интактного контроля. В группе 3 на 14-е сутки экспрессия CD11b⁺ на клетках ПП прогрессивно снижалась, при повышении показателя СИФ относительно исходных значений (рис. 3А, Б).

У мышей группы 5 и 6 на 7-е сутки после инфицирования количество CD11b⁺ клеток увеличилось в 3 раза (рис.3А), а СИФ незначительно снизилась (рис.3Б). Данный эффект можно объяснить повышенной востребованностью фагоцитов, участвующих в воспалительной реакции, с формированием вторичного иммунодефицита при развитии вирусной инфекции, а так же очевидной гибелью зрелых гранулоцитов.

Известно, что в очаге острого воспаления в первые часы популяция моноцитов/макрофагов составляет не более 5% среди клеточного инфильтрата, значительно уступая по численности зрелым гранулоцитам. Однако через 24-48 часов макрофаги становятся доминирующими клетками воспалительного инфильтрата, приходя на смену быстро погибающим гранулоцитам [20]. По этому важно определить функциональное состояние клеток МФС организма принимающих участие в развитии вирусной инфекции, что может явиться решающим моментом в формировании иммунного ответа.

Полученные в данной работе результаты свидетельствуют о том, что в момент развития гриппозной инфекции в организме происходит повышенное потребление фагоцитов при недостаточно быстром их восполнении, что при прогрессировании вирусной экспансии приводит к формированию вторичной иммунной недостаточности. Превентивное введение кЛККЧ и его компонентов способствует

сохранению и мобилизации функциональной активности клеток МФС. В группе животных, которым предварительно был введен кЛККЧ, не отмечали ингибции фагоцитарной активности моноцитов и макрофагов, что имело место у мышей других групп, инфицированных вирусом гриппа. Было отмечено, что введение нефракционированного кЛККЧ до инфицирования способствовало в большей степени, чем его компоненты, повышению функциональной активности макрофагов, которая оставалась высокой на протяжении 14-ти дней развития вирусной инфекции.

Учитывая тот факт, что макрофаги созревают из циркулирующих в крови моноцитов, имеющих костномозговое происхождение [21], можно предположить, что превентивное введение кЛККЧ оказывает воздействие на более ранние предшественники этих клеток, модифицируя их функциональную активность, что позволяет организму быстро мобилизовать средства неспецифической иммунной защиты в ответ на внедрение патогена.

Известно, что именно альвеолярные макрофаги принимают непосредственное участие в регуляции нормального иммунного ответа в ткани лёгких в условиях инфицирования респираторными вирусами, а также способны опосредованно модулировать ответные реакции других иммунокомпетентных клеток через высвобождение медиаторов [22]. Однако, клетки МФС являются гетерогенной популяцией, которая включает в себя как циркулирующие, так и резидентные фагоциты, поэтому наши исследования по изучению функциональной активности клеток ПП можно экстраполировать на альвеолярные макрофаги, т.е. превентивное введение кЛККЧ будет активизировать и альвеолярные макрофаги. Однако, это требует дальнейшего изучения.

Ранее было показано, что основной причиной гибели опытных животных, инфицированных летальной дозой вируса гриппа, является геморрагический отёк-пневмония [23]. Предварительное введение кЛККЧ препятствовало развитию выраженных деструктивных процессов в лёгких, что, возможно, и связано с более эффективной презентацией антигена клетками МФС и его скорейшей элиминацией из организма.

Полиэтиологичность острых респираторных заболеваний, отсутствие вакцинопрофилактики, кроме вакцин против вирусов гриппа, обосновывает необходимость разработки иммуностропных средств для профилактики и лечения пациентов. Большинство известных профилактических средств эффективны только во время их использования (действие сохраняется не более 1-2 недель после окончания приёма). Известно, что интраназальное введение кЛККЧ способно предупреждать развитие летальной инфекции у мышей, инфицированных гриппом в течение месяца после введения кЛККЧ [6, 23]. Полученные в настоящей работе данные продемонстрировали, что кЛККЧ оказывает и более длительный иммуномодулирующий эффект, который сохраняется в течение 6 месяцев.

Таким образом, полученные в работе результаты свидетельствуют о том, что превентивное введение кЛККЧ обеспечивает модификацию свойств клеток МФС, повышая их адгезивные свойства и активность фагоцитов, что в свою очередь обеспечивает развитие адекватной иммунной реакции при инфицировании животного вирусом гриппа.

ВЫВОДЫ

1. Превентивное введение кЛККЧ обеспечивает модификацию состояния клеток МФС и повышает экспрессию CD11b на фагоцитах.
2. Активация функционального состояния клеток МФС под влиянием превентивно введенного кЛККЧ является одним из возможных механизмов обеспечения его защитного противовирусного потенциала.
3. Превентивное введение кЛККЧ до развития вирусной инфекции можно рекомендовать как метод профилактики гриппа.

REFERENCES

1. Drugs with combined action for the treatment of ARVD in children / Chernishova O. E., Krivushev B. I. // Health of child. – 2009. - №1(16) – P. 75-78.
2. Judicious use of antibiotics for common pediatric respiratory infections / R. F. Jacobs // *Pediatr. Infect. Dis. J.* - 2000. - №19 (9). - P. 938-943.
3. Infectious and parasitological diseases: In 3 vol. / ed. by Zh. I. Vozyanova. - Kiev.: Zdorovya, 2000. - Vol. 1. – 904p.
4. New interferons based drugs against influenza viruses, including the A (H5N1) virus / Protasova S. F., Leont'eva L. I., Kozlova N. M. // *Cytokines and inflammation.* - 2007. - № 3. – P. 28-41.
5. Patent of Ukraine №31847A, IPC A01N01/02. A method for cryopreservation of cord blood hemopoietic

cells / A.O. Tsutsayeva, V.I. Grischenko, O.V. Kudokotseva [et al.]. – Fiend in: 05.11.98. Published in: 15.12.2000, bul. №7

6. A novel approach to the influenza prophylaxis / Zhelyakova I.A., Brovko Ye. V. // *Medicine of the Third Millennium: Proceedings of the Conference of Young Scientists.*– Kharkiv, 2006.– P. 93–94.
7. Hemocord – a preparation for complex therapy / Tsutsayeva A.O., Glushko T.O., Lobasenko N.P. and other // *Transplantation.*– 2003.– Vol. 4, №1.– P. 46–48.
8. Macrophages in immunity [Text] / I. Ya. Uchitel. – M, Medicine, 1978. – 124p.
9. Mechanisms of molecular and cell-mediated immunity to viruses / Popov N. N., Romanova E. A. // *Kharkiv National University Bulletin. Series Medicine.* - 2002 - № 546.
10. The molecular cell biology of interferon- γ and its receptor / Farrar M. A., Schreiber R. D.//*Annual Review of Immunology.* – 1993. - Vol. 11. - P. 571-611.
11. Principles of immunity / G. I. Abelyev // *Soros Educational Journal.* - 1996. - № 5. - P. 4-10.
12. Cytokine and infectious diseases / Fresno M., Kopf M., Rivas L.// *Immunology Today.* – 1997. - Vol. 18. - P.56-58.
13. General ethical principles of experiments in animals // *Endocrinology.* – 2003. – Vol. 8, № 1. – P. 142-145.
14. Human umbilical cord blood as the source of hemopoietic cells for clinical application. Part 2. Immunological characteristic / Goltsev A. N., Kalinichenko T. A. // *Problems of Cryobiology.* – 1998. - № 2. – P. 3-21.
15. Procurement, cryopreservation and clinical application of human cord blood haemopoietic cells: Methodical recommendations / Tsutsayeva A.O., Grischenko V.I., Kudokotseva O.V., Prokopyuc O.S. – Kharkov, 2000. – 16 p.
16. Menshokov, V. V. Laboratory methods of examination at clinic / ed. by V.V. Menshokov. – Moscow.: Medicine, 1987.- 368p.
17. Calculation method of absolute indicators of phagocytosis / M. G. Alexandrov, Kudryavitskiy A.I., Rummyantseva E.G. and other // *Laboratornoe delo.* - 1988. - №9. - P. 30-32.
18. The role of monocytes/macrophages in pathogenesis of viral infections / Plekhova N. G., Somova L. M. // *Pacific Medical Journal.* – 2010. - № 3 (41). – P. 5-9.
19. Expression and function of b2 —integrins on alveolar macrophages from human and nonhuman primates / R. K. Albert, Embree L.J., McFeely J.E. and other // *Am J Respir Cell Mol Biol.* —1992. —V. 7. —P. 182-189.
20. Neutrophilic granulocytes phenotype transformation options CD64 + CD32 + CD11b + in neonates with various infectious-inflammatory diseases / I. V. Nesterova, Kolesnikova N.V., Kleshenko E.I. and other // *Cytokines and inflammation.* – 2011. - № 4. - P. 61-65.
21. Current understanding of the cellular bases of hemo- and lymphopoiesis / Gluzman D. F., Sklyarenko L. M., Nadgornaya V. A. // *Zdorovya Ukraini.* – 2008. - №2/1. - P.55-57.
22. Characteristics of phagocytic and migration activity of alveolar macrophages of M1 and M2 phenotypes /

Lyamina S. V., Vedenikin T.Yu., Kruglov S.V. and other // Fundamental research. – 2011. - № 11. – P. 536-539.

23. Infection of animals with the influenza virus after a preliminary administration of preparation “Cryocell-Haemocord”. Report III. Study of morphofunctional state of mice lungs / Goltsev A. N., Volina V.V., Onasenko E.S. and other // Problems of cryobiology. – 2010. – Vol. 20, № 3., - P. 318-326.

УДК: 612.017.1:612.649.011.87:615.014.41

РОЛЬ МОНОЦИТАРНО-ФАГОЦИТАРНОЙ СИСТЕМЫ В ФОРМИРОВАНИИ ПРОТИВОВИРУСНОЙ РЕЗИСТЕНТНОСТИ У МЫШЕЙ ПОСЛЕ ПРЕДВАРИТЕЛЬНОГО ВВЕДЕНИЯ КРИОКОНСЕРВИРОВАННОЙ КОРДОВОЙ КРОВИ

Кожина О.Ю., Останкова Л.В., Останков М.В., Бондарович Н.А., Гольцев А.Н.

В настоящее время вопрос профилактики и поиска биологически активных веществ, способных активизировать неспецифический иммунный ответ, остается актуальным при эпидемии гриппа. Ранее установлено, что криоконсервированный лейкоконцентрат кордовой крови человека (кЛККЧ) может выступать в роли модулятора активности иммунитета. В данной работе оценивали влияние превентивного введения кЛККЧ и его компонентов на функциональную активность клеток моноцитарно-фагоцитарной системы (МФС) у мышей в условиях индуцированной гриппозной инфекции. Предварительное введение кЛККЧ и его компонентов за 6 месяцев до инфицирования вирусом гриппа повышает в 2 раза функциональную активность макрофагов, предотвращая угнетение неспецифического звена иммунитета. Таким образом, кЛККЧ препятствует развитию вторичного иммунодефицита. Отмеченное повышение фагоцитарной активности клеток перитонеальной полости и экспрессии маркера CD11b⁺ в 3 раза относительно интактного контроля после превентивного введения кЛККЧ свидетельствует о повышении адгезивного и защитного потенциала клеток МФС, что является одним из возможных механизмов формирования резистентности к вирусу гриппа. Показано, что интраназальное введение кЛККЧ до развития вирусной инфекции можно рекомендовать как метод профилактики гриппа.

Ключевые слова: криоконсервированная кордовая кровь, моноцитарно-фагоцитарная система, профилактика гриппа.

UDC: 612.017.1:612.649.011.87:615.014.41

ROLE OF MONOCYTE PHAGOCYtic SYSTEM IN FORMATION OF ANTIVIRAL RESISTANCE IN MICE AFTER PRELIMINARY INJECTION OF CRYOPRESERVED CORD BLOOD

Kozhina O.Yu., Ostankova L.V., Ostankov M.V., Bondarovich N.A., Goltsev A.N.

Now the task of preventive maintenance and search of biologically active substances, capable to make active the nonspecific immune response, remains an actual dur-

ing flu epidemic. It has been previously established, that cryopreserved leucoconcentrate of human cord blood (cLHCB) can act as modulator of activity of immunity. In the given work there was estimated influence of preventive injection of cLHCB and its components on functional activity of monocyte phagocytic system cells (MPSC) in mice in the conditions of the induced influenza infection. Preliminary introduction of cLHCB and its components 6 months prior to infection by flu virus makes 2 times increase of functional activity of macrophages, preventing inhibition of a nonspecific link of immunity. Thus, cLHCB inhibit of secondary immune deficiency development. The found increase in phagocytic activity of peritoneal cavity cells and 3 times increasing of CD11b-marker expression after preventive injection of cLHCB testifies to rise of adherence and protective potential of MPSC that is one of possible mechanisms of formation of resistance to a flu virus. It is shown, that intranasal cLHCB injection before development of viral infection it can be recommended as the method of preventive maintenance of flu.

Keywords: cryopreserved cord blood, monocyte phagocytic system, flu preventive maintenance.

УДК: 612.017.1:612.649.011.87:615.014.41

РОЛЬ МОНОЦИТАРНО-ФАГОЦИТАРНОЇ СИСТЕМИ У ФОРМУВАННІ ПРОТИВІРУСНОЇ РЕЗИСТЕНТНОСТІ У МИШЕЙ ПІСЛЯ ПОПЕРЕДНЬОГО ВВЕДЕННЯ КРИОКОНСЕРВІРОВАННОЇ КОРДОВОЇ КРОВІ

Кожина О.Ю., Останкова Л.В., Останков М.В., Бондарович М.О., Гольцев А.М.

У цей час питання профілактики й пошуку біологічно активних речовин, здатних активізувати неспецифічну імунну відповідь, залишається актуальним при епідемії грипу. Раніше встановлено, що криоконсервованний лейкоконцентрат кордової крові людини (кЛККЧ) може виступати у ролі модулятора активності імунітету. У даній роботі оцінювали вплив превентивного введення кЛККЧ і його компонентів на функціональну активність клітин моноцитарно-фагоцитарної системи (МФС) у мишей в умовах індукованої гриппозної інфекції. Попереднє введення кЛККЧ і його компонентів за 6 місяців до інфікування вірусом грипу підвищує у 2 рази функціональну активність макрофагів, запобігаючи пригніченню неспецифічної ланки імунітету після інфікування. Таким чином, кЛККЧ перешкоджає розвитку вторинного імунідефіциту. Відзначено підвищення фагоцитарної активності клітин перитонеальної порожнини й експресії маркера CD11b⁺ у 3 рази відносно інтактного контролю після превентивного введення кЛККЧ свідчить про підвищення адгезивного й захисного потенціалу клітин МФС, що є одним з можливих механізмів формування резистентності до вірусу грипу. Показано, що інтраназальне введення кЛККЧ до розвитку вірусної інфекції можна рекомендувати як метод профілактики грипу.

Ключові слова: криоконсервована кордова кров, моноцитарно-фагоцитарна система, профілактика грипу.