

ISSN 1814-6023 (Print)
ISSN 2524-2350 (Online)

УДК 576.54
<https://doi.org/10.29235/1814-6023-2019-16-2-234-243>

Поступила в редакцию 04.02.2019
Received 04.02.2019

Е. В. Дуж, А. Е. Гончаров

Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси, Минск, Республика Беларусь

ОЦЕНКА *IN VITRO* ИММУНОМОДУЛИРУЮЩИХ СВОЙСТВ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ И ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ

Аннотация. Разработан комплексный метод оценки иммуномодулирующих свойств лекарственных средств, который включает оценку экспрессии молекул CD80, HLA-DR, CD32, CD205 и CD197, продукции интерлейкина-12, показателей жизнеспособности и апоптоза дендритными клетками; определение продукции реактивных форм кислорода и оценку фагоцитоза полинуклеарными фагоцитами; анализ экспрессии молекулы CD69, а также продукцию фактора некроза опухолей- α линией клеток Jurkat-tat; оценку экспрессии молекул CD80 и HLA-DR, показателей жизнеспособности и апоптоза линией клеток Daudi.

Ключевые слова: антигенпрезентирующие клетки, дендритные клетки, иммуномодулирующие лекарственные средства, клеточные линии, проточная цитометрия

Для цитирования: Дуж, Е. В. Оценка *in vitro* иммуномодулирующих свойств биологически активных веществ и лекарственных средств / Е. В. Дуж, А. Е. Гончаров // Вест. Нац. акад. наук Беларуси. Сер. биол. наук. – 2019. – Т. 16, № 2. – С. 234–243. <https://doi.org/10.29235/1814-6023-2019-16-2-234-243>

A. V. Duzh, A. Y. Hancharou

Republican Research and Practical Center for Epidemiology and Microbiology, Minsk, Republic of Belarus

EVALUATION OF *IN VITRO* IMMUNOMODULATORY PROPERTIES OF BIOLOGICALLY ACTIVE SUBSTANCES AND DRUGS

Abstract. A new combined method for screening of immunomodulatory properties of drugs was developed, including: expression of CD80, HLA-DR, CD32, CD205 and CD197, interleukin-12 production and apoptosis by DCs; production of reactive oxygen species and evaluation of phagocytosis by neutrophils; expression of CD69 and production of tumor necrosis factor- α by Jurkat-tat cells; and CD80 and HLA-DR expression, viability and apoptosis using the Daudi cell line.

Keywords: antigen presenting cell, dendritic cells, immunomodulatory drugs, cell line, flow cytometry

For citation: Duzh A. V., Hancharou A. Y. Evaluation of *in vitro* immunomodulatory properties of biologically active substances and drugs. *Vestsi Natsyyanal'nai akademii navuk Belarusi. Seriya biological navuk = Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Medical series*, 2019, vol. 16, no. 2, pp. 234–243 (in Russian). <https://doi.org/10.29235/1814-6023-2019-16-2-234-243>

Введение. В настоящее время на мировом фармацевтическом рынке представлено более 100 иммуномодулирующих лекарственных средств (ЛС), в том числе около 30 действующих веществ [1]. Регулярное появление новых ЛС, обладающих иммуномодулирующим действием, требует оценки их иммунобиологической активности на доклиническом этапе [2, 3].

На сегодняшний день описано и используется множество различных методов исследования иммунобиологической активности ЛС как *in vitro*, так и *in vivo*, среди которых можно отметить использование лабораторных животных (преимущественно мышей), клеток крови человека и животных [4]. Все существующие методы исследования, применяемые для тестирования иммуномодулирующих веществ, в частности с использованием экспериментальных животных или на первичных культурах клеток крови человека, достаточно трудоемки, занимают много времени при их выполнении и требуют большого числа образцов для обеспечения достоверности выводов [5]. Кроме того, отсутствует единый подход к тестированию иммуномодуляторов, в частности к выбору модели исследования, к корректности подбора концентрации, условий и длительности инкубации, определяемых показателей, а также к учету и статистической обра-

ботке результатов [6]. Все это послужило стимулом для разработки современного стандартизированного комплексного метода оценки иммуномодулирующей активности веществ ЛС.

Цель исследования – разработка комплексного метода тестирования лекарственных средств подгруппы иммуномодуляторов с преимущественным использованием клеточных линий человека для возможности применения его на этапах разработки, производства и контроля качества лекарственных средств.

Материалы и методы исследования. *Культивирование перевиваемых гемopoэтических клеточных линий.* Клеточные культуры Daudi (человек, лимфома Беркитта) и Jurkat-tat (человек, Т-лимфобластный лейкоз) выращивали на питательной среде RPMI-1640, содержащей 10 %-ную термоинактивированную телячью эмбриональную сыворотку, L-глутамин, 50 мкг/мл гентамицина и пируват натрия.

Выделение мононуклеаров периферической крови (МПК) из венозной крови и получение ИНФ- α -индуцированных дендритных клеток (ДК). Мононуклеарные клетки из периферической крови доноров выделяли путем градиентного центрифугирования. Моноциты получали из фракции МПК методом адгезии. Для получения ИНФ- α -индуцированных ДК моноциты культивировали в питательной среде RPMI-1640, содержащей 10 %-ную телячью эмбриональную сыворотку и рекомбинантные человеческие цитокины (100 нг/мл ГМ-КСФ и 2000 ЕД/мл ИНФ- α) при 37 °С в увлажненной атмосфере с 5 % CO₂ в течение 4 сут для ускоренной дифференцировки ДК [7].

Культивирование бактерий. Лиофилизированные бактерии, выделенные из препарата Линекс, *Lactobacillus acidophilus*, *Bifidobacterium infantis*, *Enterococcus faecium* культивировали в чашках Петри в плотных питательных средах для каждого вида бактерий: лактокоагар, бифидумагар, энтерокоагар. После культивирования выполняли инактивацию бактерий в этаноле [8]. В ряде экспериментов получали лизаты бактерий.

Исследуемые вещества. Для оценки иммуномодулирующей активности тестировали 11 зарегистрированных в Республике Беларусь ЛС (табл. 1).

Т а б л и ц а 1. Концентрации ЛС, использованных в исследовании

Table 1. Concentrations of drugs used in the study

Действующее вещество	Торговое наименование	Лекарственная форма	Концентрация 1	Концентрация 2
ЛС на основе лиофилизированного лизата бактерий	Бронхомунал П	Капсулы	0,07 мг/мл	0,7 мг/мл
ЛС на основе живых лиофилизированных бактерий	Линекс	Капсулы	0,28 мг/мл	28 мг/мл
Инозин пранобекс	Гроприносин	Таблетки	5 мг/мл	50 мг/мл
Умифеновир	Арбидол	Капсулы	1 мг/мл	10 мг/мл
Азоксимера бромид	Полиоксидоний	Лиофилизат	0,5 мкг/мл	5 мкг/мл
ЛС на основе экстракта тимуса крупного рогатого скота (КРС)	Тимолин	Лиофилизат	0,1 мг/мл	1 мг/мл
α -Глутамил-триптофан (натриевая соль)	Тимоген	Спрей назальный дозированный	0,25 мкг/мл	2,5 мкг/мл
Высокомолекулярное соединение на основе полифенола	Кагоцел	Таблетки	0,12 мг/мл	1,2 мг/мл
ЛС на основе рибосом и клеточных мембран возбудителей респираторных инфекций	Рибомунил	Гранулы	0,75 мкг/мл	75 мкг/мл
Глюкозаминилмурамилдипептид	Ликопид	Таблетки	10 мкг	100 мкг
Сок травы эхинацеи пурпурной (<i>Echinacea purpurea</i>)	Иммунал	Раствор	2 мкл/мл	8 мкл/мл

Приготовление растворов исследуемых лекарственных средств и веществ. Концентрированные растворы исследуемых веществ готовили с учетом информации об их растворимости: на DPBS, этиловом спирте или ДМСО. Рабочие растворы готовили непосредственно перед исследованием и стерилизовали, используя шприцевые фильтры с диаметром пор 0,2 мкм.

Инкубация клеток с исследуемыми веществами. Исследования проводили в 3–6-кратных повторях. Взвесь культуры ДК, клеток линии Daudi и Jurkat-tat разливали по лункам 6-луночного планшета. Готовили по 6 планшетов с каждой культурой. Концентрация клеток составила 500 ± 50 тыс/мл. В лунки помещали следующие вещества: лунка 1 – отрицательный контроль (ОК) (100 мкл фосфатного буферного раствора); лунка 2 – положительный контроль (ПК) (ЛПС в конечной концентрации 1 мкг/мл для ДК и клеток линии Daudi, 12-миристат-13-ацетат (ФМА) в конечной концентрации 25 нг/мл – для клеток линии Jurkat-tat); лунки 3–4 – рабочие растворы исследуемого вещества (два разведения). Объем питательной среды с клетками и исследуемым веществом составлял 4 мл.

Планшеты с культурами клеток инкубировали при 37 °С в увлажненной атмосфере с 5 % CO₂. ДК и клетки линии Daudi сокультивировали с исследуемыми веществами на протяжении 24 ч, Т-клетки – 6 ч, нейтрофилы периферической крови – 30 мин. Для последующего определения внутриклеточных цитокинов в лунки планшетов с ДК и клетками линии Jurkat-tat за 3 ч до окончания инкубации вносили монензин в концентрации 10 мкг/мл. По завершении времени культивирования культуры суспендировали в лунках, взвесь помещали в пробирки, отмывали дважды в DPBS и суспендировали в 1 мл DPBS.

Определение поверхностных и внутриклеточных маркеров клеток. Фенотипирование клеток методом проточной цитометрии проводили по стандартной методике, используя моноклональные флуоресцентно меченные антитела [9].

Определение мертвых клеток и клеток в состоянии апоптоза. С целью выявления мертвых клеток использовали «витальный» интеркалирующий краситель – 7-аминоактиномицин Д, проникающий только через поврежденную клеточную мембрану, а для выявления находящихся в стадии апоптоза клеток – аннексин V, конъюгированный с FITC [10].

Определение фагоцитарной активности нейтрофилов периферической крови. В каждую лунку 24-луночного планшета вносили 100 мкл FITC-меченых бактерий ($1 \cdot 10^9$ /мл) и 400 мкл гепаринизированной донорской крови. Взвесь инкубировали на протяжении 30 мин при +37 °С. После окончания инкубации разрушали эритроциты, для чего добавляли 2 мл лизирующего раствора и инкубировали пробирки на протяжении 15 мин в темноте. Клетки осаждали, ресуспендировали в 300–500 мкл DPBS и учитывали на проточном цитометре [11].

Определение продукции свободных радикалов кислорода нейтрофилами периферической крови. Детекцию реактивных форм кислорода (reactive oxygen species – ROS) осуществляли с использованием дигидрородамина (DHR123). Для детекции ROS в 1,5 мл гепаринизированной периферической крови вносили DHR123 в концентрации 10 мкМ и доводили объем взвеси питательной средой до 3,0 мл. Взвесь инкубировали в термостате при температуре 37 °С на протяжении 10 мин. В пробирки для цитофлуориметра помещали рабочие растворы исследуемого вещества и контролей: лунка 1 – ОК (100 мкл фосфатного буферного раствора); лунка 2 – ПК (ФМА в конечной концентрации 25 нг/мл); лунки 3–5 – рабочие растворы исследуемого вещества (два разведения).

В каждую пробирку вносили по 200 мкл взвеси крови с DHR123 и инкубировали пробирки в термостате при температуре 37 °С на протяжении 30 мин. После окончания инкубации разрушали эритроциты, для чего добавляли 2 мл лизирующего раствора и инкубировали пробирки на протяжении 10 мин в темноте. Клетки осаждали, ресуспендировали в 300 мкл DPBS и учитывали на проточном цитометре [12].

Статистический анализ. Статистическую обработку данных проводили при помощи программного обеспечения Statistica (версия 10–12 StatSoft, США) и StatPlus 4.9 (AnalystSoft, США). Полученные показатели представлены в виде медианы с интерквартильным размахом в виде 25-го и 75-го процентилей. В качестве критерия достоверности различий показателей принимали уровень значимости $p < 0,05$ [13].

Результаты и их обсуждение. *Оценка влияния иммуномодулирующих лекарственных средств на антигенпредставляющие клетки.* Изучен широкий спектр молекул, которые могут служить маркерами активации ДК при доклиническом исследовании иммуномодулирующих свойств ЛС: экспрессия маркеров антигенпредставления и костимуляции: CD80 и HLA-DR;

экспрессия молекул CD32 и CD205, характеризующих интернализацию комплексов антиген–антитело, маннозиллированных или фукозиллированных антигенов;
экспрессия маркера миграционной способности ДК – CD197 (CCR7);
внутриклеточная продукция ИЛ-12.

Жизнеспособность ДК, которая оценивалась при помощи интеркалирующего красителя 7-AAD, составила более 90 % (табл. 2). Доля клеток в состоянии апоптоза не превышала более 5,6 %.

Установлено, что ЛС № 1 и № 2 на основе лиофилизированных бактерий и ЛС № 9 на основе рибосом и клеточных мембран возбудителей респираторных инфекций достоверно увеличивали экспрессию молекул CD80 ДК (более чем в 2 раза) по сравнению с ОК, при этом экспрессия этой же молекулы при сокультивировании с другими ЛС существенно не отличалась от ОК.

Полученные результаты анализа экспрессии CD197, которая указывает на миграционную способность клеток, не выявили отличий при сокультивировании ДК с ЛПС и другими тестируемыми иммуномодуляторами. Но при этом ЛС № 4 (умифеновир) в концентрациях 50 и 150 мкг/мл достоверно уменьшал содержание CD197⁺ ДК в культуре ($p = 0,016$ и $p = 0,009$ соответственно).

Исследована внутриклеточная продукция ИЛ-12, который продуцируется активированными ДК (табл. 2). Продукция ИЛ-12 без стимуляции ДК в ОК составила 1,2 (0,9–1,8) %, в ПК – 19,2 (17,5–25,1) %. Использование ЛС № 1, 2 и 9 на основе бактерий и их компонентов привело к увеличению числа продуцирующих ИЛ-12 ДК до 20 %. При сокультивировании ДК с ЛС № 3 (инозин пранобексом) продукция ИЛ-12 в обеих концентрациях увеличилась на 4,9 (3,8–5,9) и 5,6 (4,3–7,8) % соответственно по сравнению с ОК.

Т а б л и ц а 2. Показатели апоптоза, жизнеспособности, экспрессия молекулы CD197, ИЛ-12 дендритными клетками при сокультивировании с ЛС

Table 2. Indicators of apoptosis, viability, CD197, IL-12 expression by DCs during drug cocultivation

Вещество	Жизнеспособность ДК, %		Содержание ДК в состоянии апоптоза, %		CD197, %		ИЛ-12, %	
	Концентрация 1	Концентрация 2	Концентрация 1	Концентрация 2	Концентрация 1	Концентрация 2	Концентрация 1	Концентрация 2
ОК	93,4 (91,9–93,9)		4,7 (3,7–5,5)		30,1 (29,6–31,3)		1,2 (0,9–1,8)	
ПК	93,4 (92,0–94,0)		4,4 (4,2–4,8)		30,0 (27,5–33,8)		19,2 (17,5–25,1)	
ЛС № 1	92,5 (92,1–96,1)	93,1 (92,5–95,5)	1,5 (1,4–2,0)	3,2 (3,0–3,2)	29,6 (22,9–30,0)	28,1 (27,9–29,0)	18,9 (18,6–21,2)	20,3 (16,9–22,3)
ЛС № 2	93,4 (92,6–94,2)	93,9 (92,0–94,6)	3,0 (2,6–3,3)	2,7 (2,6–3,4)	33,3 (32,0–33,4)	32,0 (31,3–35,0)	16,2 (15,6–17,2)	20,3 (19,2–26,5)
ЛС № 3	92,4 (91,0–94,4)	92,6 (92,5–93,5)	3,9 (2,8–4,8)	4,1 (2,7–4,2)	28,8 (26,9–32,5)	30,4 (30,4–33,3)	4,9 (3,8–5,9)	5,6 (4,3–7,8)
ЛС № 4	90,6 (89,8–92,0)	93,9 (91,3–94,1)	1,9 (1,9–3,7)	3,7 (2,9–3,8)	18,9 (14,0–20,1)	12,3 (10,6–18,4)	1,4 (1,4–2,0)	0,8 (0,6–1,5)
ЛС № 5	94,2 (92,0–94,2)	92,6 (92,1–94,8)	2,1 (1,4–2,1)	5,6 (3,9–5,6)	32,0 (31,2–32,7)	34,4 (32,2–35,5)	1,6 (1,5–2,3)	1,5 (0,5–1,6)
ЛС № 6	94,2 (88,6–99,6)	93,4 (89,0–96,1)	3,3 (2,0–4,5)	4,1 (2,6–4,9)	35,0 (33,2–48,6)	30,2 (25,0–40,4)	0,8 (0,1–1,2)	0,9 (0,0–1,5)
ЛС № 7	91,7 (88,9–94,3)	92,4 (90,1–94,7)	2,7 (2,1–3,2)	4,5 (2,8–4,7)	20,3 (19,3–22,1)	25,1 (24,1–26,3)	2,3 (1,9–2,5)	2,4 (2,1–2,8)
ЛС № 8	92,6 (86,3–94,2)	95,1 (93,1–98,3)	1,7 (2,2–3,5)	2,6 (1,9–2,8)	25,7 (24,2–27,5)	31,2 (30,2–31,5)	2,5 (2,4–2,8)	2,7 (2,3–2,8)
ЛС № 9	93,5 (91,5–97,2)	94,6 (89,9–99,1)	3,1 (2,5–3,2)	5,1 (3,3–5,4)	31,4 (30,1–33,2)	32,6 (31,2–33,5)	15,7 (15,1–16,3)	20,9 (19,3–23,1)
ЛС № 10	91,4 (88,2–94,1)	92,9 (89,6–94,5)	4,7 (4,1–6,0)	5,7 (4,8–5,9)	33,1 (31,8–36,7)	34,5 (32,2–35,6)	1,9 (1,6–1,9)	2,4 (1,9–2,5)
ЛС № 11	92,6 (91,3–93,8)	93,7 (90,2–95,6)	2,6 (2,1–3,7)	4,2 (3,7–4,6)	27,6 (24,3–29,3)	29,5 (28,2–31,5)	0,9 (0,6–0,9)	1,3 (0,9–1,4)

Усиление экспрессии молекулы CD32 проявлялось лишь в ПК, а также на ДК, которые со-культивировали с ЛС на основе микроорганизмов или их компонентов. В ЛС синтетического происхождения в содержании CD32⁺ ДК видимых изменений не обнаружено.

Выявлена высокая концентрация молекул CD205 при стимуляции ДК с ЛПС – 178,2 (150,4–190,2) % (табл. 3), при этом ОК составил 90,7 (80,0–94,0) %. ЛС № 1 в высокой концентрации ($p = 0,01$), ЛС № 2 ($p = 0,016$) и ЛС № 9 в обеих концентрациях ($p = 0,012$) обуславливали усиление экспрессии данного рецептора на ДК. Инкубированные с инозин пранобексом в высокой концентрации ДК также отличались более высокими значениями экспрессии CD205 в сравнении с ОК ($p = 0,028$).

При культивировании ДК с ЛПС в качестве ПК экспрессия HLA-DR в клетках увеличивалась в 2 раза. Добавление ЛС № 1 на основе лизата бактерий, ЛС № 2 на основе живых бактерий и ЛС № 9 на основе рибосом и клеточных мембран возбудителей респираторных инфекций также достоверно усиливало экспрессию маркера HLA-DR на поверхности ДК ($p < 0,05$). ЛС № 3 в меньшей концентрации (5 мкг/мл) не оказывало существенного влияния на экспрессию HLA-DR ($p = 0,602$), а в концентрации 50 мкг/мл усиливало экспрессию этой молекулы ($p = 0,106$).

Т а б л и ц а 3. Экспрессия молекул CD80, HLA-DR CD32 и CD205 с ДК при сокультивировании с ЛС

Table 3. Expression of CD80, HLA-DR CD32, and CD205 molecules with DK during drug cocultivation

Вещество	CD80 ⁺ , %		HLA-DR, усл. ед.		CD32, %		CD205, усл. ед.	
	Концентрация 1	Концентрация 2	Концентрация 1	Концентрация 2	Концентрация 1	Концентрация 2	Концентрация 1	Концентрация 2
ОК	11,0 (8,0–14,0)		168,0 (156,0–197,0)		19,5 (17,5–20,3)		90,7 (80,0–94,0)	
ПК	65,0 (65,0–75,0)		320,0 (310,0–350,0)		65,8 (55,9–66,3)		178,2 (150,4–190,2)	
ЛС № 1	26,0 (21,0–32,0)	36,7 (35,2–39,6)	275,2 (275,2–285,0)	332,3 (331,1–335,4)	30,6 (27,5–32,1)	48,3 (45,6–51,5)	99,8 (90,6–100,2)	120,5 (112,2–128,9)
ЛС № 2	33,0 (29,0–36,0)	36,0 (28,5–42,1)	243,5 (242,4–247,8)	294,0 (281,9–303,2)	37,5 (32,6–38,9)	55,6 (47,0–59,8)	125,6 (117,5–135,6)	164,0 (150,8–165,0)
ЛС № 3	10,0 (9,0–11,0)	7,6 (3,4–10,4)	184,6 (169,0–210,0)	208,8 (208,5–209,5)	19,2 (17,8–20,0)	21,5 (20,2–24,5)	100,1 (95,6–105,6)	112,3 (105,6–115,6)
ЛС № 4	11,0 (10,0–12,0)	10,2 (6,2–10,9)	172,3 (169,7–176,4)	178,7 (173,6–184,1)	16,8 (14,3–21,4)	19,8 (18,9–22,9)	88,2 (86,7–96,6)	89,8 (82,2–94,9)
ЛС № 5	6,2 (5,6–11,8)	9,0 (6,5–9,8)	166,5 (157,5–172,7)	188,8 (180,4–189,3)	17,6 (17,1–22,1)	19,0 (18,6–21,9)	90,5 (89,3–95,8)	86,8 (85,0–86,9)
ЛС № 6	7,7 (5,3–11,0)	8,2 (6,2–11,6)	119,2 (118,2–137,5)	115,1 (108,0–125,0)	19,2 (17,5–23,5)	20,0 (16,4–28,9)	82,7 (79,0–86,0)	84,5 (73,2–90,4)
ЛС № 7	8,3 (7,6–7,9)	7,3 (6,9–7,4)	137,2 (135,2–139,4)	134,5 (132,2–145,3)	18,3 (16,3–21,7)	19,6 (18,3–21,2)	83,4 (79,6–86,3)	88,2 (83,2–91,5)
ЛС № 8	5,1 (4,9–5,7)	6,2 (5,6–7,1)	154,1 (151,5–165,3)	155,6 (151,2–165,3)	17,5 (15,9–18,3)	17,5 (16,3–18,9)	87,4 (84,5–88,6)	89,5 (86,5–92,6)
ЛС № 9	32 (29,3–32,8)	37 (35,6–37,5)	265,0 (249,6–279,3)	297,0 (269,3–307,5)	38,5 (37,3–42,6)	48,4 (45,6–51,9)	132,8 (126,3–143,2)	158,7 (144,3–165,3)
ЛС № 10	9,7 (9,6–10,6)	9,8 (9,5–10,2)	142,6 (138,5–151,8)	144,2 (132,5–154,2)	16,3 (15,6–18,5)	17,3 (16,5–19,7)	87,3 (85,7–88,6)	90,3 (86,3–93,5)
ЛС № 11	7,4 (6,8–7,7)	6,5 (6,2–7,1)	123,8 (121,6–126,4)	119,7 (114,3–132,7)	18,6 (17,5–21,3)	19,4 (18,6–21,3)	78,3 (75,3–81,6)	79,3 (74,3–83,2)

Оценка функциональной активности нейтрофилов крови. Под действием исследуемых ЛС с иммуномодулирующей активностью определяли интенсивность фагоцитоза и продукцию ими свободных радикалов кислорода.

Интенсивность фагоцитоза при воздействии ЛС на основе бактерий (№ 1, № 2) и ЛС № 9 на основе рибосом и клеточных мембран усиливалась в сравнении с ОК ($p < 0,01$), при этом активность ЛС на основе лиофилизированного лизата бактерий была сравнима с ЛПС, а эффект ЛС на основе живых лиофилизированных бактерий был несколько слабее ($p = 0,004$). При тестировании

остальных ЛС разного происхождения и концентраций не наблюдалось существенных различий в интенсивности фагоцитоза ($p > 0,05$).

Оценка с помощью флуоресцирующего зонда DHR123 продукции свободных радикалов кислорода (табл. 4) показала, что доля нейтрофилов, продуцирующих свободные радикалы кислорода без стимуляции, составила 5,0 (3,0–5,0) %. У ЛС на основе бактерий и их компонентов (№ 1, 2, 9) выявлена способность к стимуляции респираторного взрыва (>80 %) ($p < 0,03$), сравнимая с ПК. Установлена корреляция между разностью концентраций ЛС № 1 и их способностью стимулировать кислородный взрыв ($p = 0,012$). Статистически достоверных различий в продукции свободных радикалов кислорода при воздействии на нейтрофилы остальных ЛС не выявлено ($p < 0,01$).

Т а б л и ц а 4. Результаты оценки интенсивности фагоцитоза флуоресцентно меченных бактерий нейтрофилами и продукции свободных радикалов кислорода нейтрофилами при сокультивировании с ЛС

Table 4. Results of evaluation of the phagocytosis intensity of fluorescently marked bacteria by neutrophils and assessment of the production of the reactive oxygen species by neutrophils during drug cocultivation

Вещество	Интенсивность фагоцитоза, усл.ед.		p (в сравнении с ОК)	Продукция свободных радикалов кислорода, %		p (в сравнении с ОК)
	Концентрация 1	Концентрация 2		Концентрация 1	Концентрация 2	
ОК	406,7 (406,3–450,5)			5,0 (3,0–5,0)		
ПК	543,6 (531,6–564,7)			98,0 (97,0–98,0)		
ЛС № 1	524,4 (509,3–555,5)	540,3 (537,4–544,3)	0,001	80,0 (80,0–820)	92,0 (89,0–92,0)	0,012
ЛС № 2	472,0 (451,9–506,9)	509,6 (505,3–513,9)	0,004	92,0 (88,0–93,0)	93,0 (93,0–94,0)	0,023
ЛС № 3	399,0 (370,0–470,8)	398,4 (392,5–402,0)	0,561	6,6 (5,9–7,4)	5,0 (4,1–6,1)	0,598
ЛС № 4	391,7 (350,8–414,0)	382,4 (378,4–390,9)	0,856	2,2 (0,4–4,1)	4,9 (4,0–5,2)	0,752
ЛС № 5	410,5 (390,0–437,0)	397,2 (390,3–402,3)	0,658	6,6 (5,0–8,4)	6,1 (6,0–6,8)	0,635
ЛС № 6	385,2 (372,3–424,9)	391,0 (381,2–400,5)	0,519	5,7 (4,6–6,9)	5,1 (4,5–5,6)	0,896
ЛС № 7	405,2 (392,7–460,4)	389,0 (387,6–404,4)	0,596	6,2 (5,2–6,7)	5,5 (5,1–5,9)	0,623
ЛС № 8	398,1 (386,2–406,2)	401,3 (386,3–412,6)	0,659	3,7 (3,5–3,9)	3,4 (3,1–3,8)	0,541
ЛС № 9	501,8 (491,2–510,5)	495,6 (486,3–507,3)	0,001	91,0 (87,0–94,3)	92,6 (89,5–94,6)	0,019
ЛС № 10	395,3 (386,2–409,7)	389,6 (376,8–401,2)	0,789	6,5 (6,1–7,6)	5,9 (5,1–6,8)	0,865
ЛС № 11	387,2 (365,8–395,3)	388,2 (378,2–395,6)	0,753	4,7(4,1–5,2)	4,6 (4,1–5,5)	0,449

Оценка функциональной активности Т-клеток. Клетки линии Jurkat-tat сокультивировали с ЛС в двух разных концентрациях на протяжении 6 ч. В качестве ПК использовали ФМА. Активацию Т-клеток определяли с помощью классического маркера CD69. Оценивали также продукцию ФНО- α клетками в ответ на стимуляцию ЛС (табл. 5).

Согласно результатам исследования, ФМА вызывал активацию более 75 % клеток линии Jurkat-tat ($p = 0,012$), а ЛС № 1 в высокой концентрации, ЛС № 2 в обеих концентрациях и ЛС № 9 – усиление экспрессии молекулы CD69⁺ клетками ($p < 0,01$). Инкубация с ЛС № 3–11, в том числе с тималином и тимогеном, не привела к увеличению числа CD69⁺ клеток линии Jurkat-tat (табл. 5).

Установлено, что ФМА вызывал усиление продукции ФНО- α более чем у 25 % клеток линии Jurkat-tat ($p = 0,012$). ЛС № 1, № 2 и ЛС № 9 в обеих концентрациях также способствовали усилению продукции этой молекулы клетками ($p < 0,01$).

Оценка функциональной активности В-клеток. В экспериментах для оценки влияния ЛС на функциональную активность В-клеток была использована клеточная линия Daudi. С учетом того, что спектр поверхностных молекул ДК и В-клеток в целом схож, для оценки функции В-клеток в ответ на стимуляцию ЛС успешно использовали два маркера для оценки функции антигенпрезентирующих клеток (АПК): CD80 и HLA-DR.

Показано, что ЛПС и ЛС № 1, 2 и 9 достоверно усиливали экспрессию маркера CD80 клетками линии Daudi ($p < 0,05$) (табл. 6).

Установлено, что ЛПС, ЛС на основе бактерий и инозин пранобекс как в низкой ($p = 0,03$), так и в высокой ($p = 0,009$) концентрации усиливали экспрессию молекулы HLA-DR клетками линии Daudi (табл. 6).

Т а б л и ц а 5. Экспрессия молекул CD69, ФНО- α Т-клетками при сокультивировании с ЛСTable 5. Expression of CD69, TNF- α molecules with T-cells during drug cocultivation

Вещество	CD69*, %		p (с ОК)	ФНО- α^* , %		p (с ОК)
	Концентрация 1	Концентрация 2		Концентрация 1	Концентрация 2	
ОК	15,0 (14,0–15,0)			3,6 (3,4–4,5)		
ПК	76,0 (75,0–79,0)			26,6 (22,5–29,7)		
ЛС № 1	28,0 (24,0–29,0)	40,0 (35,0–41,0)	0,001	7,5 (6,9–8,3)	8,5 (7,6–8,8)	0,002
ЛС № 2	18,0 (15,0–20,0)	26,0 (25,0–27,0)	0,003	7,6 (7,5–8,6)	11,2 (10,6–11,5)	0,003
ЛС № 3	13,0 (13,0–14,0)	17,5 (16,5–18,9)	0,912	2,2 (1,2–3,2)	1,1 (0,7–2,1)	0,856
ЛС № 4	12,0 (6,9–14,0)	13,8 (13,1–14,5)	0,661	1,1 (0,9–1,4)	0,7 (0,6–1,2)	0,789
ЛС № 5	12,5 (10,0–14,0)	15,3 (13,2–16,4)	0,552	1,2 (0,8–1,2)	2,2 (2,2–2,2)	0,659
ЛС № 6	12,5 (10,6–13,0)	12,8 (12,0–12,8)	0,526	3,6 (2,5–3,6)	1,9 (1,9–2,5)	0,596
ЛС № 7	12,3 (11,2–15,0)	13,1 (11,7–14,9)	0,756	4,5 (3,5–5,4)	4,1 (3,5–4,5)	0,658
ЛС № 8	11,9 (9,6–12,2)	12,3 (11,6–13,2)	0,936	3,1 (2,8–3,5)	3,2 (2,8–3,6)	0,753
ЛС № 9	30,2 (28,6–31,2)	36,5 (34,2–37,9)	0,006	8,0 (7,6–8,5)	10,3 (10,1–11,5)	0,004
ЛС № 10	12,6 (11,5–13,6)	12,7 (11,9–13,2)	0,589	2,7 (2,2–2,9)	2,8 (2,4–2,9)	0,756
ЛС № 11	13,2 (12,5–14,6)	13,8 (12,6–14,1)	0,741	4,1 (3,8–4,3)	3,8 (3,5–3,9)	0,958

Т а б л и ц а 6. Экспрессия молекул CD80, HLA-DR В-клетками при сокультивировании с ЛС

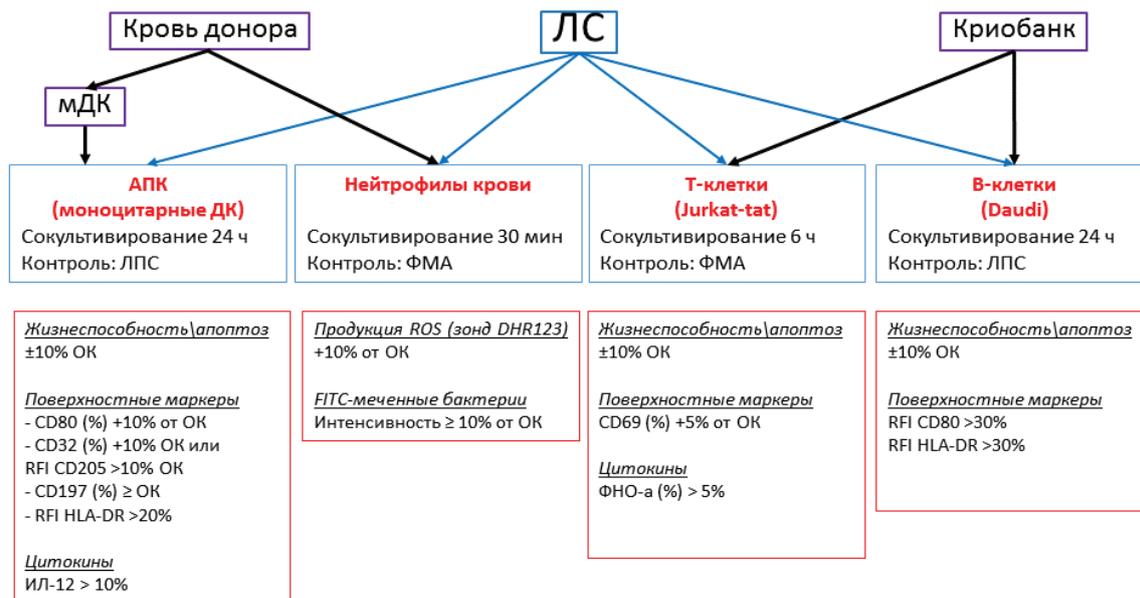
Table 6. Expression of CD80, HLA-DR molecules with B-cells during drug cocultivation

Вещество	CD80, усл. ед.		HLA-DR, усл. ед.	
	Концентрация 1	Концентрация 2	Концентрация 1	Концентрация 2
ОК	40,0 (38,0–45,0)		141,0 (139,0–149,0)	
ПК	68,0 (65,8–80,7)		220,0 (214,0–222,0)	
ЛС № 1	79,1 (73,5–86,5)	81,4 (80,2–86,0)	192,0 (191,0–200,0)	199,8 (199,6–202,1)
ЛС № 2	61,2 (59,7–63,2)	69,2 (65,8–72,1)	183,0 (174,0–191,0)	197,6 (196,4–197,6)
ЛС № 3	45,8 (44,4–48,2)	40,8 (38,3–42,0)	166,0 (155,0–167,0)	171,0 (169,7–176,1)
ЛС № 4	36,9 (29,9–37,3)	37,5 (35,9–37,9)	126,9 (121,7–138,4)	143,4 (142,0–144,1)
ЛС № 5	40,4 (37,9–41,9)	38,9 (35,0–42,2)	130,8 (125,7–133,9)	140,9 (140,3–142,9)
ЛС № 6	39,8 (32,4–42,4)	40,9 (35,8–42,8)	145,9 (131,9–147,6)	145,0 (144,3–147,3)
ЛС № 7	36,2 (31,8–39,2)	41,1 (40,1–46,9)	132,5 (128,9–137,2)	144,4 (139,1–147,1)
ЛС № 8	34,6 (32,6–38,2)	39,8 (36,5–41,2)	141,6 (135,2–143,7)	153,2 (146,2–159,3)
ЛС № 9	70,2 (68,2–72,6)	77,3 (74,3–81,2)	190,3 (181,3–198,2)	200,6 (195,3–201,3)
ЛС № 10	34,2 (32,5–37,5)	36,1 (35,2–39,4)	161,4 (154,3–168,5)	159,6 (154,8–165,5)
ЛС № 11	35,3 (33,2–37,9)	35,2 (32,5–37,9)	138,5 (135,6–142,3)	140,2 (135,6–141,2)

В результате проведенных нами исследований был разработан комплексный метод оценки *in vitro* биологической активности иммуномодулирующих ЛС, включающий сокультивирование исследуемых веществ с ДК, нейтрофилами, клетками линий Daudi и Jurkat-tat и последующую оценку экспрессии ряда поверхностных и внутриклеточных молекул, фагоцитарной активности и продукции свободных радикалов кислорода (см. рисунок).

Разработанный комплексный метод оценки *in vitro* иммуномодулирующих свойств ЛС включает наиболее информативные показатели, пригодные для рутинного тестирования:

1) оценку экспрессии молекул CD80, HLA-DR, CD32, CD205 и CD197, продукции интерлейкина-12, показателей жизнеспособности и апоптоза дендритными клетками;



Алгоритм исследования иммуномодулирующих свойств ЛС
 Algorithm of the research of immunomodulatory properties of drugs

2) определение продукции реактивных форм кислорода и оценку фагоцитоза нейтрофилами периферической крови;

3) анализ экспрессии молекулы CD69, а также продукцию фактора некроза опухолей-α линией клеток Jurkat-tat;

4) оценку экспрессии молекул CD80 и HLA-DR линией клеток Daudi.

На основании проведенных исследований нами предложены критерии для определения иммунобиологической активности ЛС.

Условия, при которых исследуемое вещество может рассматриваться как активирующее АПК:

увеличение числа ДК, экспрессирующих молекулы CD32 и CD80 на 10 % и более в сравнении с ОК;

усиление интенсивности экспрессии молекулы HLA-DR на 20 % и более в сравнении с ОК;

усиление интенсивности экспрессии молекулы CD205 на 10 % и более в сравнении с ОК;

число ДК в стадии апоптоза/некроза не отличается более чем на 10 % в сравнении с ОК;

число ДК, экспрессирующих молекулу CD197 соответствует таковому в ОК или превышает его; более 10 % ДК продуцируют ИЛ-12.

Условия, при которых исследуемое вещество может рассматриваться как активирующее нейтрофилы периферической крови:

продукция реактивных форм кислорода (ROS) составляет более 10 % в сравнении с ОК;

усиление интенсивности фагоцитоза на 10 % в сравнении с ОК.

Условия, при которых исследуемое вещество может рассматриваться как активирующее Т-клетки:

экспрессия молекулы CD69 после культивирования клеток линии Jurkat-tat с ФМА (25 нг/мл) в качестве ПК составляет не менее 30 %;

экспрессия молекулы CD69 после культивирования клеток Jurkat-tat с иммуномодуляторами составляет не менее 5 % в сравнении с ОК, а экспрессия внутриклеточного ФНО-α – более 5 % в сравнении с ОК.

Условия, при которых исследуемое вещество может рассматриваться как активирующее В-клетки:

увеличение интенсивности экспрессии молекул CD80 клетками линии Daudi на 30 % и более в сравнении с ОК;

усиление интенсивности экспрессии молекулы HLA-DR клетками линии Daudi на 30 % и более в сравнении с ОК;

число нежизнеспособных клеток отличается не более чем на 10 % по сравнению с ОК.

Заключение. Разработанный метод оценки показал, что ЛС микробного происхождения на основе живых штаммов пробиотических бактерий, а также лизатов бактерий – возбудителей инфекций дыхательных путей и ЛС, содержащие рибосомы и клеточные мембраны, выделенные из возбудителей респираторных инфекций, обладают выраженным стимулирующим действием на АПК, нейтрофилы, В-клетки и, в меньшей степени, на Т-клетки.

Установлено, что наиболее информативными показателями, пригодными для рутинного определения, являются содержание CD80⁺, CD32⁺, CD197⁺ ИЛ-12⁺ ДК и интенсивность экспрессии молекул CD205 и HLA-DR ДК.

ЛС на основе инозина пранобекса (группа иммуномодуляторов синтетического происхождения) оказали активирующее действие на ДК и В-клетки, что проявилось в усилении экспрессии молекул CD205, HLA-DR и продукции ИЛ-12.

ЛС синтетического и растительного происхождения (на основе умифеновира, азоксимера бромид, полифенола, глюкозаминилмурамилдипептида, сока травы эхинацеи) и тимического происхождения (α -глутамил-триптофан, экстракт тимуса крупного рогатого скота) не оказали влияния на функциональную активность клеток иммунной системы.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Список использованных источников

1. Иммуномодуляторы бактериальной природы, зарегистрированные в Российской Федерации / Т. И. Немировская [и др.] // Биопрепараты. Профилактика, диагностика, лечение. – 2014. – № 3. – С. 19–26.
2. Guo, R. Complementary medicine for treating or preventing influenza or influenza-like illness / R. Guo, M. H. Pittler, E. Ernst // *Amer. J. Med.* – 2007. – Vol. 120, N 11. – P. 923–929.e3. <https://doi.org/10.1016/j.amjmed.2007.06.031>
3. Фещенко, Ю. И. Особенности современной иммуномодулирующей терапии / Ю. И. Фещенко, Е. М. Рекалова // *Астма та алергія.* – 2013. – № 1. – С. 6–12.
4. Marx, V. Models: stretching the skills of cell lines and mice / V. Marx // *Nat. Meth.* – 2014. – Vol. 11, N 6. – P. 617–620. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2966>
5. Дуж, Е. В. Моноцитарные дендритные клетки как модель для тестирования иммуномодуляторов *in vitro* / Е. В. Дуж, А. Е. Гончаров // *Новости мед.-биол. наук.* – 2016. – Т. 13, № 2. – С. 108–116.
6. Methods for testing an immune response using cultures of T cells, B cells, dendritic cells and follicular dendritic cells : pat. US8962319, USA : IPC C12N5/071; C12N5/0781; C12N5/0783; C12N5/0784; C12Q1/00;G01N33/50 (2013.01) / W. L. Warren, D. Drake, J. Moser, I. Singh, H. Song, E. Mishkin, J. G. Tew; publ. date : 24.02.2015.
7. Характеристика культур дендритных клеток для иммунотерапии рака поджелудочной железы / А. Е. Гончаров [и др.] // *Вест. Нац. акад. наук Беларусі. Сер. мед. наук.* – 2014. – № 2. – С. 4–12.
8. Current and past strategies for bacterial culture in clinical microbiology / J.-C. Lagier [et al.] // *Clin. Microbiol. Rev.* – 2015. – Vol. 28, N 1. – P. 208–236. <https://doi.org/10.1128/cmr.00110-14>
9. Дуж, Е. В. Сравнительный профиль экспрессии поверхностных и внутриклеточных молекул Т-лимфоцитарных клеточных линий человека / Е. В. Дуж, А. Е. Гончаров // *Новости мед.-биол. наук.* – 2018. – Т. 18, № 3. – С. 126–134.
10. Оптимизация метода получения дендритных клеток из гемопоэтических стволовых клеток костного мозга для иммунотерапии пациентов с туберкулезом / А. Е. Гончаров [и др.] // *Докл. НАН Беларусі.* – 2012. – Т. 56, № 4. – С. 94–102.
11. Взаимодействие бифидобактерий и их компонентов с полинуклеарами и монопнуклеарами крови человека / Л. П. Титов [и др.] // *Вест. Нац. акад. наук Беларусі. Сер. мед. наук.* – 2013. – № 2. – С. 10–18.
12. Взаимодействие лактобацилл и их компонентов с нейтрофилами, моноцитами и лимфоцитами периферической крови человека / Л. П. Титов [и др.] // *Вест. Нац. акад. наук Беларусі. Сер. мед. наук.* – 2013. – № 3. – С. 19–27.
13. A guide to modern statistical analysis of immunological data / B. Genser [et al.] // *BMC Immunol.* – 2007. – Vol. 8, N 1. – Art. 27. <https://doi.org/10.1186/1471-2172-8-27>

References

1. Nemirovskaya T. I., Kovtun V. P., Abramtseva M. V., Aleksandrova N. V., Tarasov A. P., Salakhova R. D., Volkov V. A., Merkulov V. A. Immunomodulators of bacterial origin registered in the Russian Federation. *Biopreparaty. Profilaktika, diagnostika, lechenie* [Biological products. Prevention, diagnosis, treatment], 2014, no. 3, pp. 19–26 (in Russian).
2. Guo R., Pittler M. H., Ernst E. Complementary medicine for treating or preventing influenza or influenza-like illness. *American Journal of Medicine*, 2007, vol. 120, no. 11, pp. 923–929.e3. <https://doi.org/10.1016/j.amjmed.2007.06.031>

3. Feshchenko Yu. I., Rekalova E. M. The peculiarities of modern immunomodulating therapy. *Astma ta alergiya = Asthma and allergy*, 2013, no. 1, pp. 6–12 (in Ukrainian).
4. Marx V. Models: stretching the skills of cell lines and mice. *Nature Methods*, 2014, vol. 11, no. 6, pp. 617–620. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2966>
5. Duzh E. V., Goncharov A. E. Monocytic dendritic cells as a model for testing immunomodulators in vitro. *Novosti mediko-biologicheskikh nauk = News of biomedical sciences*, 2016, vol. 13, no. 2, pp. 108–116 (in Russian).
6. Warren W. L., Drake D., Moser J., Singh I., Song H., Mishkin E., Tew J. G. Methods for testing an immune response using cultures of T cells, B cells, dendritic cells and follicular dendritic cells : pat. US8962319, USA : IPC C12N5/071; C12N5/0781; C12N5/0783; C12N5/0784; C12Q1/00;G01N33/50 (2013.01), 2015.
7. Goncharov A. E., Romanova I. V., Zalutskii I. V., Prokhorov A. V., Papok V. I. Generation of dendritic cells cultured for immunotherapy of pancreatic cancer patients. *Vestsi Natsyyanal'nai akademii navuk Belarusi. Seryya medytsynskikh navuk = Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Medical series*, 2014, no. 2, pp. 4–12 (in Russian).
8. Lagier J.-C., Edouard S., Pagnier I., Mediannikov O., Drancourt M., Didier R. Current and past strategies for bacterial culture in clinical microbiology. *Clinical Microbiology Reviews*, vol. 28, no. 1, pp. 208–236. <https://doi.org/10.1128/cmr.00110-14>
9. Duzh E. V., Goncharov A. E. Comparative profile of surface and intracellular molecule expression of human t-lymphocyte cell lines. *Novosti mediko-biologicheskikh nauk = News of biomedical sciences*, 2018, vol. 18, no. 3, pp. 126–134 (in Russian).
10. Goncharov A. E., Titov L. P., Romanova I. V., Skryagin A. E., Solodovnikova V. V., Shpakovskaya N. S., Skryagina E. M. Optimization of the method of dendritic cell generation from hematopoietic bone marrow derived stem cells for the purposes of immunotherapy of patients with tuberculosis. *Doklady Natsional'noi akademii nauk Belarusi = Reports of the National Academy of Sciences of Belarus*, 2012, vol. 56, no. 4, pp. 94–102 (in Russian).
11. Titov L. P., Goncharov A. E., Murashko A. S., Golovneva N. A., Kolomiets E. I. Interaction of bifidobacterial and their components with polynuclear and mononuclear human blood cells. *Vestsi Natsyyanal'nai akademii navuk Belarusi. Seryya medytsynskikh navuk = Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Medical series*, 2014, no. 2, pp. 4–12 (in Russian).
12. Titov L. P., Goncharov A. E., Murashko A. S., Golovneva N. A., Naidenko I. A., Kolomiets E. I. Interaction of lactobacilli and their components with neutrophils, monocytes and lymphocytes of human peripheral blood. *Vestsi Natsyyanal'nai akademii navuk Belarusi. Seryya medytsynskikh navuk = Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Medical series*, 2013, no. 3, pp. 19–27 (in Russian).
13. Genser B., Cooper P. J., Yazdanbaksh M., Barreto M. L., Rodrigues L. C. A guide to modern statistical analysis of immunological data. *BMC Immunology*, 2007, vol. 8, no. 1, art. 27. <https://doi.org/10.1186/1471-2172-8-27>

Информация об авторах

Дуж Елена Васильевна – науч. сотрудник. Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси (ул. Академическая, 27, 220072, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: lenaduzh@gmail.com

Гончаров Андрей Евгеньевич – канд. мед. наук, директор. Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси (ул. Академическая, 27, 220072, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: andrei.hancharou@gmail.com

Information about the authors

Alena V. Duzh – Researcher. Institute of Biophysics and Cell Engineering of the National Academy of Sciences of Belarus (27, Akademicheskaya Str., 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: lenaduzh@gmail.com

Andrei Y. Hancharou – Ph. D. (Med.), Director. Institute of Biophysics and Cell Engineering of the National Academy of Sciences of Belarus (27, Akademicheskaya Str., 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: andrei.hancharou@gmail.com