

УДК 616.1-06-079-08:616.432.001.12

## ИЗУЧЕНИЕ ВЛИЯНИЯ ПОЛИОКСИДОНИЯ НА РЕГУЛЯТОРНЫЕ Т-КЛЕТКИ СТАРЫХ КРЫС

Э.Е. Нурашева, Р.Р. Тухватшин

Установлено, что у старых животных по сравнению с молодыми преобладала супрессорная активность лимфоцитов, тогда как содержание Т-хелперов, выполняющих регуляторную функцию, было существенно сниженным. Отмечен значительный прирост абсолютного содержания CD3+ и CD4+ лимфоцитов у старых крыс под влиянием полиоксидония, что послужило обоснованием иммунокорректирующей эффективности при возрастассоциированной дисфункции регуляторных Т-клеток иммунной системы.

*Ключевые слова:* старые крысы; Т-хелперы; Т-супрессоры; лимфоциты; полиоксидоний.

---

## THE INFLUENCE ON POLYOXIDONIUM REGULATORY T CELLS OLD RATS

E.E. Nurashcheva, R.R. Tuhvatshin

It is established that in older animals compared with younger prevailed suppressor activity of lymphocytes, whereas the content of T-helper cells that perform a regulatory function, was significantly reduced. It is noted a significant increase in the absolute content of CD3+ and CD4+ lymphocytes in old rats, under influence of polyoxidonium which was the rationale for the effectiveness of immuno polyoxidonium at age dysfunction of regulatory T cells in the immune system.

*Key words:* old rats; T-helper cells; T-suppressor lymphocytes polyoxidonium. term studies observed

Возрастзависимые изменения в иммунной системе приводят к повышению чувствительности к инфекционным заболеваниям, увеличению заболеваемости и смертности. Для усиления иммунитета при старении необходимо четкое понимание того, какие дефекты и какие механизмы в клетках иммунной системы ответственны за возрастобусловленное ослабление активности иммунитета [1–6].

В пожилом возрасте также резко снижается эффективность вакцинации, что ограничивает профилактику инфекционных заболеваний. Кроме того, существующие на данный момент геронпротекторы оказывают противоречивое действие на продолжительность жизни [7–9]. Зачастую оно укладывается в пределы горметического диапазона, установленного для неспецифического компенсаторного стресс-ответа (20–30 %), что ставит под сомнение их направленное воздействие на механизмы старения.

В связи с вышеизложенным целью настоящего исследования явилось изучение корректирующего влияния синтетического иммуномодулятора полиоксидония на хелперно-супрессорную активность регуляторных Т-клеток старых крыс.

**Материал и методы.** Эксперименты выполнены на 20 белых крысах-самцах массой 220–340 г, содержащихся в стандартных условиях вивария на обычном пищевом рационе. Проведены 2 серии экспериментов: 1 серия – молодые интактные крысы; 2 серия – старые интактные крысы. В каждой серии было по 10 крыс. Исследования проводили через одну и две недели от начала эксперимента с соблюдением биоэтических норм и правил проведения экспериментов с участием животных. Взятие крови у животных проводили под хлороформовым наркозом. Показатели иммунного статуса определяли с помощью неконъюгированных моноклональных антител фирмы CALTAG Laboratories рецепторов к CD3+, CD4+, CD8+ Т-лимфоцитам крыс в медицинском центре «Имунодиагностика».

Процедуры статистического анализа выполнялись с помощью статистических пакетов STATISTICA-7 и SPSS-16. Значение уровня статистической значимости принималось в случаях  $p \leq 0,05$ . С целью обнаружения связи между исследуемыми показателями проводили корреляционный анализ путем вычисления коэффициента

Таблица 1 – Влияние полиоксидония на состояние хелперно-супрессорной активности лимфоцитов крови старых крыс

Показатели	N	Старые		Старые+ПО		U-критерий Манна – Уитни
		Me (CO)	25–75 %	Me (CO)	25–75 %	
1 неделя						
CD3+, %	10	55,0 (6,4)	48,0–57,0	60,0 (4,4)	58,0–64,0	0,002* z = -3,137
CD3+, абс. ч.	10	2,5 (0,6)	2,4–2,6	3,1 (0,5)	2,8–3,6	0,001* z = -3,250
CD4+, %	10	29,0 (4,2)	28,0–32,0	36,5 (3,2)	35,0–38,0	< 0,0001* z = -3,477
CD4+, абс. ч.	10	0,7 (0,2)	0,6–0,8	1,1 (0,3)	1,0–1,3	< 0,0001* z = -3,326
CD8+, %	10	23,0 (3,4)	20,0–26,0	23,5 (3,6)	23,0–27,0	0,427*
CD8+, абс. ч.	10	0,6 (0,2)	0,5–0,7	0,8 (0,2)	0,7–0,9	0,006* z = -2,721
CD4+/CD8+	10	1,3 (0,2)	1,1–1,4	1,6 (0,2)	1,4–1,8	0,041* z = -2,041
Уровень статистической значимости: * – отношение леченных полиоксидонием старых крыс к нелеченым.						

Таблица 2 – Влияние полиоксидония на состояние хелперно-супрессорной активности лимфоцитов крови старых крыс

Показатели	N	Старые		Старые+ПО		U-критерий Манна – Уитни
		Me (CO)	25–75 %	Me (CO)	25–75 %	
2 неделя						
CD3+, %	10	56,5 (7,1)	50,0–58,0	58,5 (2,1)	57,0–60,0	0,082* 0,174**
CD3+, абс. ч.	10	2,5 (0,7)	2,1–2,9	3,7 (0,8)	3,2–4,2	0,008* z = -2,646 0,130**
CD4+, %	10	31,0 (4,6)	27,0–32,0	35,5 (1,4)	35,0–36,0	0,002* z = -3,099 0,307**
CD4+, абс. ч.	10	0,7 (0,3)	0,6–1,0	1,4 (0,3)	1,1–1,4	0,003* z = -2,948 0,290**
CD8+, %	10	24,0 (3,5)	23,0–26,0	23,5 (1,2)	22,0–24,0	0,406* 0,496**
CD8+, абс. ч.	10	0,6 (0,3)	0,5–0,7	0,8 (0,2)	0,7–1,0	0,028* z = -2,192 0,364**
CD4+/CD8+	10	1,2 (0,1)	1,1–1,3	1,6 (0,1)	1,5–1,6	< 0,0001* z = -3,628 0,970**
Уровень статистической значимости: * – отношение леченных полиоксидонием старых крыс к нелеченым; ** – второй недели к первой.						

ранговой корреляции Спирмена  $r$ . Полученную корреляцию считали статистически значимой при  $p \leq 0,05$ .

**Результаты и обсуждение.** Предыдущими исследованиями было установлено, что у старых животных по сравнению с молодыми преобладала супрессорная активность лимфоцитов, тогда как содержание Т-хелперов, выполняющих регуляторную функцию, было существенно сниженным. Иммунорегуляторный индекс, характеризовавший соотношение хелперно-супрессорных лимфоцитов, выявил преимущественную дифференцировку супрессорных лимфоцитов у старых крыс.

Нарушение иммунной регуляции Т-лимфоцитов с прогрессивным ростом CD8<sup>+</sup> Т-клеток, секретирующих провоспалительные цитокины, продемонстрировало неспособность фагоцитарного звена иммунитета к встрече с антигенами бактериальной, вирусной и др. природы. Так, у старых крыс метаболическая активность нейтрофилов, исследованная в НСТ-тесте, была более чем на 30 % менее выраженной, чем у молодых особей. Стимуляция пирогеналом метаболической активности нейтрофилов приводила лишь к незначительной активации последней, уровень которой оказался почти в 2 раза меньше показателей молодых крыс. Исследование *in vitro* поглотительной активности нейтрофилов старых животных показало аналогичную картину. Так, и спонтанная, и индуцированная латексом поглотительная активность нейтрофилов в оба срока исследования не достигала уровня молодых крыс. Это свидетельствовало о снижении метаболической и поглотительной активности нейтрофилов у старых крыс.

Нарушение хелперно-супрессорной активности лимфоцитов у старых крыс характеризовало возрастную инволюцию тимуса, когда пул наивных Т-клеток перестает пополняться.

Лечение полиоксидонием старых крыс приводило к статистически значимому увеличению пула наивных CD3<sup>+</sup> лимфоцитов на 9,1 % ( $p = 0,002$ ,  $z = -3,137$ ) (таблица 1).

Прирост абсолютного числа CD3<sup>+</sup> лимфоцитов под влиянием полиоксидония составил 48 % ( $p = 0,001$ ,  $z = -3,250$ ). Медиана (интерквартильный размах) абсолютного содержания CD4<sup>+</sup> лимфоцитов составила 1,1 (интерквартильный размах от 1,0 до 1,3), которая была на 57,1 % статистически значимо большей ( $p < 0,0001$ ,  $z = -3,326$ ) по сравнению с медианой нелеченных старых особей.

Относительное содержание CD8<sup>+</sup> лимфоцитов под влиянием полиоксидония не претерпело никаких изменений, тогда как их абсолютное количество превышало показатели нелеченных старых крыс на 33,3 % ( $p = 0,006$ ,  $z = -2,721$ ). Однако

прирост CD4<sup>+</sup> лимфоцитов по сравнению с нарастанием содержания CD8<sup>+</sup> лимфоцитов у старых крыс под влиянием полиоксидония был на 23,8 % более выраженным.

В результате проведенного корреляционного анализа была установлена высокая положительная корреляционная связь (коэффициент корреляции = 0,92) между приростом абсолютного содержания CD3<sup>+</sup> лимфоцитов и CD4<sup>+</sup> лимфоцитов. И наоборот, обнаружена отрицательная корреляционная зависимость (коэффициент корреляции = -0,89) между содержанием CD8<sup>+</sup> лимфоцитов и ИРИ. Так, было установлено, что чем ниже абсолютное содержание CD8<sup>+</sup> лимфоцитов, тем выше значение ИРИ, что характеризовало иммунокорректирующую эффективность полиоксидония.

Исследования, проведенные через 2 недели после лечения полиоксидонием, показали продолжающийся прирост наивных лимфоцитов, абсолютное содержание которых было на 48 % больше, чем у нелеченных ( $p = 0,008$ ,  $z = -2,646$ ) (таблица 2).

Под влиянием полиоксидония у старых особей наблюдалось двукратное увеличение абсолютного содержания CD4<sup>+</sup> лимфоцитов ( $p = 0,003$ ,  $z = -2,948$ ), что свидетельствовало о нарастании хелперной активности лимфоцитов. Об этом свидетельствовало также статистически значимое увеличение ИРИ на 33,3 % ( $p < 0,0001$ ,  $z = -3,628$ ).

Таким образом, под влиянием полиоксидония в оба срока исследования отмечался существенный прирост абсолютного содержания CD3<sup>+</sup> и CD4<sup>+</sup> лимфоцитов у старых крыс, что послужило обоснованием иммунокорректирующей эффективности полиоксидония при возрастассоциированной дисфункции регуляторных Т-клеток иммунной системы.

#### Литература

1. Ботерашвили Д.И. Возрастные особенности лечения идиопатического мембранозно-пролиферативного гломерулонефрита / Д.И. Ботерашвили, А.М. Есаян, А.Ш. Румянцев и др. // Успехи геронтологии. 2012. Т. 25. № 3. С. 483–490.
2. Рыжак Г.А. Особенности метаболического синдрома у женщин пожилого возраста с ишемической болезнью сердца и артериальной гипертензией / Г.А. Рыжак, Ж.А. Желтышева // Успехи геронтологии. 2012. Т. 25. № 1. С. 79–84.
3. Carl H. June. Principles of adoptive T cell cancer therapy // J Clin Invest. 2007 May.
4. Qing Zhou, Christoph Bucher, Meghan E. Munger, Steven L. Highfill, Jakub Tolar, David H. Munn, Bruce L. Levine, Megan Riddle, Carl H. June, Daniel A. Vallera, Brenda J. Weigel, and Bruce R. Blazar. Depletion of endogenous tumor-associated regulatory T cells improves the efficacy of adoptive

- cytotoxic T cell immunotherapy in murine acute myeloid leukemia. *Blood*. 2009 Sep.
5. Sansoni P, Vescovini R, Fagnoni F, Biasini C, Zanni F, Zanlari L, Telera A, Lucchini G, Passeri G, Monti D, Franceschi C, Passeri M. The immune system in extreme longevity. *Exp Gerontol*. 2009; 43:61–65.
  6. Lescai F, Blanche H, Nebel A, Beekman M, Sahbatou M, Flachsbarth F, Slagboom E, Schreiber S, Sorbi S, Passarino G, Franceschi C. Human longevity and 11p15.5: a study in 1321 centenarians // *Eur J Hum Genet*. 2009; 17: 1515–9.
  7. Hars E.S., Qi H., Ryazanov A.G., Jin S., Cai L., Hu C., Liu L.F. Autophagy regulates ageing in *C. elegans*. *Autophagy*. 2007 Mar-Apr; 3 (2):93–5.
  8. Boyce M., Py B.F., Ryazanov A.G., Minden J.S., Long K., Ma D., Yuan J. A pharmacoproteomic approach implicates eukaryotic elongation factor 2 kinase in ER stress-induced cell death. *Cell Death Differ*. 2008 Mar; 15 (3):589–99.
  9. Drennan D., Ryazanov A.G. Alpha-kinases: analysis of the family and comparison with conventional protein kinases. *Prog Biophys Mol Biol*. 2004 May; 85(1):1–32.