

БЕЛОРУССКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ  
УНИВЕРСИТЕТ



На правах рукописи

УДК615.37:615.03

**НОВИКОВА**  
Ирина Александровна

**БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИЕ И МЕДИЦИНСКИЕ  
АСПЕКТЫ ЭКСТРАКОРПОРАЛЬНОЙ  
ИММУНОФАРМАКОТЕРАПИИ**

**14.00.36. - Аллергология и иммунология**

**Автореферат  
диссертации на соискание ученой степени  
доктора медицинских наук**

**Минск 2001**

Работа выполнена в Витебском государственном медицинском университете

Научные консультанты:

Заслуженный деятель науки и техники РФ,  
доктор медицинских наук профессор **А.Ю.Барышников**  
*Российский онкологический научный центр РАМН, НИИ  
экспериментальной диагностики и терапии опухолей*

доктор медицинских наук профессор **Г.П.Адаменко**  
*Витебский государственный медицинский университет, кафедра  
клинической лабораторной диагностики с курсом последипломного  
медицинского и фармацевтического образования*

Официальные оппоненты:

доктор медицинских наук профессор **С.В.Федорович**  
*Белорусский научно-исследовательский санитарно-гигиенический  
институт, заведующий лабораторией профпатологии*

доктор медицинских наук профессор **Э.А.Доценко**  
*Республиканский липидный лечебно-диагностический центр  
метаболической терапии (г. Витебск), директор*

Лауреат Государственной премии Беларуси  
доктор медицинских наук профессор **Н.В.Пивень**  
*Институт биоорганической химии Национальной Академии Наук,  
заведующая лабораторией медицинского микроанализа*

Оппонирующая организация:

Институт иммунологии МЗ РФ (г. Москва)

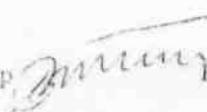
Защита состоится «19» сентября 2001 г. в 15 часов на заседании  
совета по защите диссертаций Д 03.18.05 при Белорусском  
государственном медицинском университете по адресу:  
220116 г. Минск, пр. Дзержинского, 83, тел. 272-55-98

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Белорусского  
государственного медицинского университета

Автореферат разослан «15» ноября 2001 г.

Ученый секретарь

совета по защите диссертаций

доктор медицинских наук профессор  Г.Н.Чистенко

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

### Актуальность темы диссертации

В настоящее время установлена ключевая роль иммунологических механизмов в формировании, развитии и исходе острых и хронических воспалительных заболеваний [В.И.Стручков, 1978; Р.М.Хаитов и соавт., 1994; Б.В.Пинегин и соавт., 1998]. Дестабилизация иммунного гомеостаза способствует прогрессированию заболеваний, приводит к осложнениям, затяжному течению, снижает эффективность проводимой терапии [Д.Н.Маянский, 1991; М.Г.Сачек и соавт., 1994; Б.В.Пинегин и соавт. 1999]. Поэтому различные способы диагностики и коррекции иммунологических нарушений прочно вошли в комплексную медицинскую программу лечения воспалительных заболеваний, способствуя выздоровлению или достижению длительной клинической ремиссии [Р.В.Петров и соавт., 2000; Р.М.Хаитов, Б.В.Пинегин, 2000]. Наряду со значительными успехами иммуномодулирующей терапии, в последние годы появились данные, указывающие на ряд серьезных проблем, вызывающих сложности в вопросах применения иммунокоррекции. Это прежде всего недостаточная эффективность иммунокорректирующих средств, выраженные побочные реакции, даже токсичность ряда препаратов, отсутствие адекватных методов подбора соответствующего лечения. Большинство из известных и широко используемых в настоящее время иммуномодуляторов типа препаратов тимуса, бактериальных препаратов и вакцин, препаратов интерферона и интерлейкинов, природных и синтетических пептидов, в связи с коротким периодом их жизни в организме, требуют поддержания высоких концентраций для достижения клинического результата, что приводит к сенсibilизации организма и определенным токсическим эффектам [Г.Н. Дранник и соавт., 1994; В.М.Шичкин, 1998]. С другой стороны, нарушение нормального функционирования и взаимодействия клеток иммунной системы вследствие эндогенной интоксикации, сопровождающей не только тяжелые деструктивные, но и вялотекущие воспалительные заболевания, приводит к развитию фармакорезистентности и изменяет направленность иммуномодулирующей активности препаратов [Е.Р.Черных и соавт., 1997; В.И.Сидельникова, В.М.Лифшиц, 1998]. Кроме того, при традиционных путях введения иммуномодуляторов может происходить быстрое снижение их эффективной концентрации вблизи клеток-мишеней вследствие процессов ферментативного гидролиза, а также связывания препаратов с биологически активными вмешательствами межклеточной жидкости [Г.Н.Дранник и соавт., 1994 ]

В связи с вышеизложенным, особую актуальность приобретает поиск новых путей иммунокоррекции. Согласно современным концепциям иммунофармакологии, применение иммуностимулирующих препаратов должно обеспечивать системный регулируемый ответ [Б.С.Утешев и соавт., 1995; А.Н.Чередеев, Л.В.Ковальчук, 1997]. Наиболее целесообразно и перспективно применение методов иммунокоррекции, оказывающих на иммунные реакции опосредованное действие, то есть запускающих собственные иммунорегулирующие системы организма. Таким требованиям отвечают различные модификации так называемых «адоптивных» методов терапии, в основе которых лежат трансфузии аутологичных иммунокомпетентных клеток, активированных в условиях *in vitro* [И.С.Гущин и соавт., 1987; В.П.Лесков и соавт., 1993; S.A.Rosenberg, 1984; V. Osband, G. Carpinto, 1988]. Интерес к такому методу терапии связан с его высокой клинической эффективностью у больных различного профиля [С.М.Юдина и соавт., 1995; А.А.Останин и соавт., 1996; Т.В.Латышева, 1996; Н. Soda, 1999]. В настоящее время разработан оригинальный способ адоптивной иммунотерапии, предусматривающий обработку аутологичных лейкоцитов лекарственными препаратами в условиях *in vitro*, с последующей реинфузией больному модифицированных клеток, и названный «экстракорпоральная иммунофармакотерапия» (ЭИФТ) [Н.С.Прозоровский и соавт., 1992; В.П.Лесков, И.С.Гущин, 1993]. Метод обладает рядом преимуществ перед стандартным применением иммуномодуляторов, заключающихся в возможности прямого влияния на клетки, информативного контроля за дозировкой и временем воздействия препаратов, практическом отсутствии побочных эффектов [В.П.Лесков и соавт., 1986; Л.В.Лусс и соавт., 1992]. Показано, что ЭИФТ диуцифоном, ИЛ-2, имунофаном, преднизолоном приводит к развитию быстрого и стойкого лечебного эффекта при различных патологических состояниях: тяжелом атопическом синдроме, инфекционно-зависимой бронхиальной астме, термических поражениях, у больных сепсисом [О.М.Курбачева и соавт., 1992; Т.В.Латышева, 1996; Э.К.Файст и соавт., 1998; А.А.Останин и соавт., 2000].

В то же время, следует отметить, что широкому практическому внедрению экстракорпоральной иммунофармакотерапии мешает недостаточная клиническая апробация при различных заболеваниях, малый спектр изученных препаратов, отсутствие адекватных методов прогнозирования эффективности. Недостаточность научных данных, раскрывающих конкретные механизмы реализации эффекта модифицированных препаратами лейкоцитов, обуславливает часто эмпирический подход к назначению экстракорпоральных схем иммунокоррекции у больных.

Отсутствует патогенетически обоснованная концепция стратегии применения иммуномодуляторов по экстракорпоральной схеме в лечении наиболее часто встречающихся иммунопатологических синдромов - аутоиммунного и инфекционного. Решение этих вопросов представляет первостепенную важность для клиники и обуславливает актуальность выбранной тематики.

### **Связь работы с крупными научными программами, темами**

Диссертационная работа выполнялась в Витебском государственном медицинском университете в рамках темы научно-исследовательской работы ЦНИЛ «Разработка методов мониторинга экстракорпоральной иммунокорректирующей терапии» (№ госрегистрации 1995956, сроки выполнения 01.01.1995-31.12.1997; ответственный исполнитель темы И.А.Новикова) и кафедры клинической лабораторной диагностики Витебского ордена Дружбы народов государственного медицинского университета «Биотехнологические и медицинские подходы к иммунокорректирующей и противовоспалительной терапии гнойно-воспалительных заболеваний мягких тканей», зарегистрированной в Центре государственной регистрации НИОКР Республики Беларусь под № 20002085 (научный руководитель темы профессор Г.П.Адаменко, ответственный исполнитель И.А.Новикова; сроки выполнения 01.01.2000-31.12.2001).

**Цель исследования:** разработать биотехнологические подходы и медицинские критерии экстракорпоральной иммунофармакотерапии гнойно-воспалительных заболеваний и ревматоидного артрита на основе выявления закономерностей и механизмов взаимодействия обработанных иммуномодуляторами и интактных иммунокомпетентных клеток.

### **Задачи исследования:**

1. Исследовать иммуномодулирующие эффекты и механизмы действия импульсно обработанных лекарственными препаратами или физическими факторами мононуклеарных клеток на интактные мононуклеары и нейтрофилы в аутологичной смешанной культуре; оценить роль рецепторных и медиаторных факторов межклеточных взаимодействий в реализации эффекта.

2. На основании модельных исследований *in vitro* оптимизировать биотехнологические аспекты метода экстракорпоральной иммунофармакотерапии (ЭИФТ).

3. Разработать лабораторные критерии индивидуального прогнозирования эффективности экстракорпоральной иммунофармакотерапии при гнойно-воспалительных заболеваниях.

4. Разработать показания и оценить клинко-иммунологическую эффективность предлагаемой технологии ЭИФТ при лечении ревматоидного артрита с применением преднизолона.

5. Обосновать целесообразность применения разработанного метода ЭИФТ в лечении гнойно-воспалительных заболеваний с использованием тималина и стафилококкового анатоксина.

**Объект и предмет исследования.** Объектом исследования явились больные ревматоидным артритом, гнойной хирургической инфекцией, кадровые доноры станции переливания крови. Предмет исследования: показатели клеточного и гуморального иммунитета, неспецифических факторов защиты, интерлейкинового звена, эндокринного статуса.

#### **Методология и методы проведенного исследования**

1. Комплексное клинко-лабораторное обследование больных.

2. Иммунологические методы: определение основных популяций и субпопуляций иммунокомпетентных клеток крови в реакции иммунофлуоресценции с использованием моноклональных антител и в реакции розеткообразования, оценка гуморального иммунитета по концентрации в сыворотке иммуноглобулинов, циркулирующих иммунных комплексов, молекул средней массы, определение функциональных свойств лимфоцитов в реакции бластной трансформации, реакции торможения миграции; оценка микробицидной активности нейтрофилов по тесту восстановления нитросинего тетразолия; оценка цитокинпродуцирующей функции мононуклеаров иммуноферментным методом.

3. Методы одномерного и многомерного статистического анализа.

#### **Научная новизна и значимость полученных результатов**

Впервые показано, что мононуклеарные клетки крови (МНК), обработанные в импульсном режиме фармакологическими (тималин, стафилококковый анатоксин, преднизолон, эуфиллин) или физическими (He-Ne лазерное излучение) иммуностропными средствами в смешанной культуре с аутологичными интактными клетками модулируют экспрессию CD2, HLA-DR антигенов на МНК, функциональную активность нейтрофилов, спонтанную и стимулированную ЛПС продукцию ФНО $\alpha$  мононуклеарными клетками. Установлено, что для реализации такого иммуномодулирующего эффекта необходимо прямое межклеточное взаимодействие модифицированных МНК с интактными. Эффект не воспроизводится под влиянием растворимых факторов монокультур об-

работанных иммуномодуляторами клеток. Впервые выявлено, что регуляторная активность модифицированных мононуклеаров опосредована высвобождением в ранние сроки их совместного культивирования с интактными клетками растворимых факторов, обладающих примиряющим и комитогенным эффектом на интактные нейтрофилы и мононуклеары. Впервые разработана клеточная модельная система для индивидуального лабораторного прогнозирования эффективности экстракорпоральной иммунофармакотерапии. С помощью методов математического моделирования произведена оценка прогностической значимости этой системы и определены наиболее информативные лабораторные тесты при гнойно-воспалительных заболеваниях.

На основании полученных данных теоретически обоснован, разработан и клинически апробирован импульсный режим проведения экстракорпоральной фармакологической иммунокоррекции. Впервые произведена оценка клинико-иммунологической эффективности ЭИФТ тималином и стафилококковым анатоксином в комплексной терапии больных гнойной хирургической инфекцией. Установлено, что ЭИФТ тималином способствует быстрому купированию проявлений системной воспалительной реакции и сокращает сроки госпитализации при сепсисе.

Впервые показано иммуномодулирующее действие ЭИФТ стафилококковым анатоксином на показатели специфического и неспецифического иммунитета у больных рецидивирующей гнойной инфекцией, заключающееся в увеличении титров антистафилококковых антител, увеличении количества  $CD25^+$  и  $HLA-DR^+$  мононуклеаров, нормализации соотношения иммунорегуляторных субпопуляций Т-лимфоцитов, восстановлении метаболического резерва нейтрофилов и их фагоцитарной активности. Новыми являются данные о коррекции дефектов цитокиновой сети при рецидивирующей гнойной инфекции под влиянием ЭИФТ стафилококковым анатоксином, что проявляется нормализацией уровня ИЛ- $1\beta$  в сыворотке и его спонтанного синтеза МНК и увеличением спонтанной и стимулированной ЛПС продукции ФНО $\alpha$  мононуклеарами больных. Впервые продемонстрирована возможность использования ЭИФТ стафилококковым анатоксином в виде монотерапии при хронической хирургической инфекции и достоверное увеличение межрецидивного периода на фоне такой терапии.

Впервые проведена оценка клинико-иммунологической эффективности ЭИФТ преднизолоном у больных ревматоидным артритом, определены показания и критерии назначения ЭИФТ. Установлено влияние ЭИФТ преднизолоном на активность воспалительного процесса в суставах и выраженный иммуномодулирующий эффект, проявляющийся нормализацией соотношения иммунорегуляторных субпопуляций Т-

лимфоцитов, уменьшением экспрессии маркеров активации (HLA-DR) на мононуклеарах, модуляцией продукции цитокинов (ИЛ-1 $\beta$  и ФНО $\alpha$ ) in vivo и in vitro. Впервые показано, что в течение всего курса экстракорпоральной иммунотерапии преднизолоном у больных ревматоидным артритом не развивается резистентности к глюкокортикоидам.

Новизна исследований подтверждена авторским свидетельством и заявками на изобретения. По материалам диссертации получено авторское свидетельство N 1704084 «Способ первичного скрининга иммуномодуляторов на иммуномодулирующую активность». Поданы 2 заявки на изобретения, на которые получены приоритетные документы: «Способ активации иммунореактивности организма у больных стафилококковой инфекцией» (соавтор В.П.Булавкин, N 19990070, приоритет от 26/01/99), «Способ оценки иммуномодулирующей активности химических и физических факторов» (№ 19980256, приоритет от 17.03.1998).

### **Практическая (экономическая, социальная) значимость полученных результатов**

Предложена и экспериментально обоснована модификация метода ЭИФТ, предусматривающая кратковременную импульсную обработку мононуклеаров иммуностропными средствами, которая значительно упрощает проведение метода, не приводит к травматизации клеток и одновременно вызывает оптимальную иммуномодуляцию.

Определена значимость лабораторных иммунологических показателей в оценке эффективности ЭИФТ при перечисленных нозологических формах.

Разработана и апробирована клеточная модель для лабораторного прогнозирования эффекта экстракорпоральной иммуномодуляции, которая характеризуется высоким коэффициентом детерминации у больных гнойной хирургической инфекцией. С помощью такой модели выявлены наиболее значимые для лабораторного мониторинга больных гнойной инфекцией иммунологические тесты - показатели спонтанной и стимулированной метаболической активности гранулоцитов. В перспективе с использованием данной модели для каждого вида патологии могут быть определены оптимальные иммунологические лабораторные тесты, которые помогут унифицировать индивидуальный подбор иммуномодуляторов. Причем для этого вполне достаточно применения недорогостоящих рутинных лабораторных иммунологических исследований.

Экстракорпоральная иммунокоррекция преднизолоном, тималином и стафилококковым анатоксином в вышеуказанной модификации апробирована соответственно на больных ревматоидным артритом (РА), гнойно-септическими заболеваниями, рецидивирующей гнойной инфек-

цией. В целом, экстракорпоральные схемы применения препаратов позволили снизить затраты на лечение и долговременную медицинскую реабилитацию больных данной патологией.

ЭИФТ тималином при сепсисе позволила сократить сроки пребывания больных в стационаре на  $9\pm 2$  дня. С учетом средней стоимости одного койко-дня по Витебской областной клинической больнице, равной приблизительно 10 у. е., экономический эффект только по данной позиции составляет около 90 у. е. на 1 больного.

Экстракорпоральные схемы применения стафилококкового анатоксина при рецидивирующей гнойной инфекции позволили значительно повысить частоту клинического выздоровления больных (86%), снизить количество рецидивов болезни, а, следовательно, необходимость повторной госпитализации. При стандартной терапии эти больные имеют до 2-3 рецидивов в год. Поэтому, с учетом средней длительности их пребывания в стационаре (12,6 дня) и стоимости одного койко-дня (10 у.е.), применение ЭИФТ дает экономический эффект, равный 252 у.е на одного больного, что предполагает среднегодовой экономический эффект на лечебное учреждение типа Витебской областной клинической больницы приблизительно 9828 у.е.

Экстракорпоральные схемы применения преднизолона у больных ревматоидным артритом позволили достигнуть состояние клинической ремиссии применением минимальных доз глюкокортикоидов, снизить частоту рецидивов заболевания, в ряде случаев устранить гормонозависимость, обеспечив тем самым повышение качества жизни пациентов. Только за счет уменьшения потребности в гормонах удается снизить затраты на лечение в среднем на 3,4 у.е. на 1 больного, что, с учетом количества больных данной нозологией в областной больнице за год, дает среднегодовой экономический эффект 1714 у.е.

По материалам диссертационного исследования подготовлены и утверждены министерством здравоохранения Республики Беларусь методические рекомендации «Комплексная экстракорпоральная коррекция иммунологической недостаточности у больных хирургического и терапевтического профиля» (утверждена МЗ РБ 08.07.1999 г., рег.И 64-9905), «Комплексное применение методов фотомодификации крови в гнойной хирургии» (утверждена МЗ РБ 29.07.1994, рег.№ 58-9408), «Применение иммунокорректирующих средств в гнойной хирургии и прогнозирование их эффективности» (утверждена МЗ РБ в 1991 г.).

Результаты исследований используются в работе ряда учреждений здравоохранения республики Беларусь, а также в учебном процессе и научно-исследовательской работе иммунологического отдела ЦНИИ, кафедр клинической лабораторной диагностики, госпитальной хирургии и кафедр последипломного обучения.

### Основные положения диссертации, выносимые на защиту

1. Мононуклеарные клетки крови здоровых лиц и больных гнойно-воспалительными заболеваниями, обработанные в импульсном режиме фармакотерапевтическими (тималин, стафилококковый анатоксин, преднизолон, эуфиллин) или физическими (He-Ne лазерное излучение) иммуностропными средствами, оказывают иммуномодулирующее действие на экспрессию рецепторов и функциональные свойства аутологичных интактных мононуклеаров и нейтрофилов в условиях их совместной инкубации в смешанной культуре *in vitro*.

2. Иммуномодулирующий эффект мононуклеарных клеток, обработанных фармакологическими или физическими иммуномодуляторами, на интактные мононуклеары и нейтрофилы *in vitro* реализуется в условиях прямого межклеточного взаимодействия и опосредован высвобождением в ранние сроки совместного культивирования клеток растворимых факторов, обладающих примиряющим и комитогенным эффектом на интактные нейтрофилы и мононуклеары.

3. Клеточная модельная система, основанная на взаимодействии в аутологичной смешанной культуре *in vitro* обработанных иммуномодуляторами и интактных мононуклеаров, является высоко информативной для индивидуального прогнозирования эффекта иммуномодуляторов при экстракорпоральной терапии гнойно-воспалительных заболеваний.

4. Импульсно обработанные лекарственными препаратами аутологичные иммунокомпетентные клетки могут быть использованы для экстракорпоральной иммунофармакотерапии (ЭИФТ) при гнойно-воспалительных заболеваниях и ревматоидном артрите.

5. Импульсный режим проведения ЭИФТ с применением преднизолона в более короткие, чем при стандартной терапии, сроки подавляет активность воспалительного процесса, нормализует соотношение иммунорегуляторных субпопуляций Т-лимфоцитов, уменьшает экспрессию маркеров активации (HLA-DR) на мононуклеарах, модулирует *in vitro* и *in vivo* продукцию провоспалительных цитокинов ИЛ-1 $\beta$  и ФНО $\alpha$  у больных ревматоидным артритом.

6. Применение иммуномодуляторов методом ЭИФТ при гнойно-воспалительных заболеваниях повышает их клинико-иммунологическую эффективность по сравнению с традиционными методами использования препаратов. ЭИФТ тималином сопровождается быстрой положительной динамикой в отношении системной воспалительной реакции, сокращает сроки госпитализации и устраняет иммунологические нарушения у больных сепсисом. ЭИФТ стафилококковым анатоксином у

больных рецидивирующей гнойной инфекцией как в составе комплексной терапии, так и в виде монотерапии, позволяет в 2,8 раза увеличить межрецидивный период и оказывает выраженное иммунокорригирующее действие на состояние специфического и неспецифического иммунитета.

#### **Личный вклад соискателя**

Диссертантом самостоятельно сформулированы цель и задачи исследования, определены основные этапы и направления их достижения, выбраны методы и объем исследования. Лично автором проведено экспериментальное обоснование экстракорпоральных подходов к применению иммуномодуляторов, осуществлен анализ иммуномодулирующих свойств модифицированных лимфоцитов, разработана и апробирована модельная система для лабораторного подбора иммуномодуляторов, разработаны критерии стратегии применения экстракорпоральных схем введения препаратов у больных гнойной хирургической инфекцией и ревматоидным артритом. Клинико-иммунологическое обследование и мониторинг всех больных, прогнозирование эффективности лечения, изучение отдаленных результатов лечения, анализ архивных документов, взятие биологического материала и подготовка его к исследованию, статистическая обработка клинико-лабораторных данных проведены автором самостоятельно. Сформирована компьютерная база данных, проведена статистическая обработка и интерпретация результатов. Публикации написаны лично автором, среди соавторов - врачи, которые проводили сбор анамнеза, клинические наблюдения за больными, необходимое оперативное лечение, а также сотрудники лабораторий, в которых проводилось параклиническое обследование больных.

#### **Апробация результатов диссертации**

Основные научные положения диссертации доложены на:

- I Всесоюзном иммунологическом съезде (Сочи, 1989);
- II международном симпозиуме по иммунологии (Дагомыс, 1990);
- III съезде Белорусского научного общества иммунологов и аллергологов (Гродно, 1995);
- Joint Annual Meeting (Vienna, 1995);
- 8<sup>th</sup> International symposium of Staphylococci and Staphylococcal infections (Aix-les-Bains, France, 1996);
- 7<sup>th</sup> International congress for Infections diseases (Hong-Kong, 1996);

- 1 Белорусском международном конгрессе хирургов (Витебск, 1996);
- 13<sup>th</sup> European Immunology Meeting (Amsterdam, 1997);
- 4<sup>th</sup> International symposium of Clinical Immunology (Amsterdam, 1997);
- 8<sup>th</sup> International congress of Infections diseases (Boston, 1998);
- IV съезде Белорусского научного общества иммунологов и аллергологов (Гомель, 2000)
- 48-55 научных сессиях Витебского государственного медицинского института-университета (1991-2000).

### **Опубликованность результатов**

По материалам диссертации опубликовано 42 научные работы, в том числе: 1 монография, 8 статей в научных журналах, 10 - в рецензируемых сборниках научных трудов, 1 описание к авторскому свидетельству, 3 методические рекомендации, 19 тезисов докладов и выступлений на научных конференциях (из них 7 за рубежом).

Всего опубликовано 305 страниц, из них личный вклад автора составляет 83%.

Часть результатов проведенных исследований находится в глобальной компьютерной сети Интернет. Материалы, представленные автором на 13<sup>th</sup> European Immunology Meeting (Amsterdam, 1997), размещены на сайте <http://www.hbznrw.de/elsevier01652478/sz97-6812/> и зарегистрированы на поисковых системах Fast Search, Lycos.

### **Структура и объем диссертации**

Работа построена и оформлена согласно «Инструкции по оформлению диссертации и автореферата», утвержденной ВАК Республики Беларусь от 24 декабря 1997 г. постановлением президиума ВАК № 178.

Диссертация состоит из введения, общей характеристики работы, основной части, состоящей из 8 глав, заключения, списка использованных источников и приложения.

Полный объем диссертации составляет 198 страниц, из них объем, занимаемый иллюстрациями и таблицами составляет 27 страниц.

Список литературы включает 359 использованных источников, в том числе 171 отечественных и 188 иностранных.

## ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

### Материал и методы исследования

Объектом исследования были 320 кадровых доноров станции переливания крови, 42 больных ревматоидным артритом, 178 больных гнойной хирургической инфекцией (27 - фурункулез, 115 хронический остеомиелит, 36 - сепсис).

Больные получали общепринятое для данной патологии комплексное лечение, в состав которого включалось применение иммуномодуляторов по стандартной или экстракорпоральной схеме.

Методика проведения экстракорпоральной иммунокоррекции была следующей. Из 500 мл венозной крови больного в стерильных условиях выделяли лейкоциты в количестве  $1,5-3,5 \cdot 10^9$ , обогащенные мононуклеарами. Популяционный состав выделяемых клеток: гранулоциты - 36-51%, лимфоциты - 45-57%, моноциты - 3-8%. Клетки отмывали от плазмы, разводили в 200 мл физиологического раствора, добавляли один из выбранных иммуномодуляторов - очищенный адсорбированный стафилококковый анатоксин (0,1 ЕС на 1мл лейкосуспензии), тималин (0,1 мг/мл) или преднизолон (0,15 мг/мл). Клеточную взвесь инкубировали при 37°C в течение 30 минут. После инкубации клетки трижды отмывали в 200 мл физиологического раствора и, после контроля на жизнеспособность (не менее 95% живых клеток в тесте с трипановым синим), реинфузировали больному внутривенно капельно. Курс лечения состоял из 3 процедур с интервалом 2 дня при лечении преднизолоном, с интервалом 3 дня при применении тималина, и с интервалом 5-7 дней при использовании стафилококкового анатоксина.

Для обследования больных использовали комплекс современных клинических и лабораторных методов исследования: детальный анализ течения воспалительного процесса, рентгенологические, функциональные исследования, а также различные методы лабораторной диагностики.

Лабораторное обследование больных включало определение следующих параметров:

- гематологические показатели (определение концентрации гемоглобина, количества эритроцитов, лейкоцитов, тромбоцитов, расчет цветового показателя, подсчет лейкоцитарной формулы) [А.И.Карпищенко, 1998];
- показатели системы гемостаза (коагулограмма) [А.И.Карпищенко, 1998];
- общий анализ мочи [А.И.Карпищенко, 1998];

- биохимические показатели сыворотки крови (общий белок - по биуретовой реакции, альбумин - унифицированным методом по реакции с бромкрезоловым зеленым, С-реактивный белок - в реакции преципитации с антисывороткой к С-реактивному белку, ревматоидный фактор - в реакции гемагглютинации (Ваалер-Розе), мочевины - уреазным методом, креатинин - по цветной реакции Яффе, глюкоза - глюкозооксидазным методом, сиаловые кислоты - унифицированным резорциновым методом, уровень гормонов в сыворотке - радиоиммунным методом) [А.И.Карпищенко, 1998]; уровень молекул средней массы методом осаждения с трихлоруксусной кислотой [Н.И.Габриэлян, В.И.Липатова, 1984];
- бактериологические исследования (идентификация бактерий-возбудителей гнойной инфекции с помощью тест-систем на биохимическом анализаторе АТВ Expression фирмы «bioMerieux», оценка чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам - на биохимическом анализаторе АТВ Exргеvзюп и методом стандартных бумажных дисков и серийных разведений на плотной питательной среде) [А.И.Карпищенко, 1998];
- иммунологические параметры.

Иммунологическое обследование больных включало определение следующих показателей клеточного и гуморального иммунитета:

- ◆ количество Т-активных и Т-общих лимфоцитов в реакции розеткообразования с эритроцитами барана (Еа-РОК, Е-РОК) [Д.К.Новиков, В.И.Новикова, 1987].
- ◆ экспрессия основных дифференцировочных маркеров с помощью моноклональных антител серии ИКО («Диагнотех», Москва) против антигенов CD3, CD4, CD8, CD25, HLA-DR лимфоцитов [А.Ю.Барышников, 1990] в реакции иммунофлуоресценции;
- ◆ уровень иммуноглобулинов в сыворотке методом радиальной иммунодиффузии в агаре [А.И.Карпищенко, 1998];
- ◆ уровень циркулирующих иммунных комплексов в сыворотке методом преципитации с полиэтиленгликолем [V.Haskovaa et al., 1978];
- ◆ титр антистафилококковых антител в реакции нейтрализации гемолитических свойств стафилококка [А.И.Карпищенко, 1998];
- ◆ уровень цитокинов в сыворотке и способность мононуклеаров к продукции цитокинов иммуноферментным методом [А.И.Карпищенко, 1998].

Мононуклеарные (МНК) и полиморфноядерные лейкоциты (ПЯЛ) из периферической крови обследуемых выделяли путем центрифугирования лейкоцитов на градиенте плотности фиколаверографина ( $d = 1,077$ ). Чистота суспензии мононуклеаров (окраска галлоцианином) - 96-98%. Чистота выделенных ПЯЛ - 96-97%.

В ряде экспериментов проводили дополнительное удаление из суспензии мононуклеаров прилипающих клеток методом адгезии к пластику. Среди неприлипших клеток было 93-95% лимфоцитов (окраска галлоцианином).

Жизнеспособность клеток определялась на всех этапах работы в тесте исключения трипанового синего и составляла не менее 95%.

Для изучения клеточных и медиаторных механизмов ЭИФТ использовали смешанную культуру обработанных иммуномодуляторами (15%) и интактных (85%) аутологичных мононуклеаров (в ряде исследований лейкоцитов) [В.П.Лесков и соавт., 1984] при концентрации  $2,5 \times 10^6$  на 1 мл культуральной среды, состоящей из RPMI-1640, 20мМ буфера HEPES и 2мМ L-глутамина. В части экспериментов среда дополнительно содержала 10% сыворотки крови человека группы АВ (IV) и растворы антибиотиков - пенициллина и стрептомицина в конечной концентрации 100 ЕД/мл. Обработку МНК иммуномодуляторами проводили в течение 30 минут при  $37^\circ\text{C}$  в следующих конечных концентрациях: тималин - 100 мкг/мл, стафилококковый анатоксин (СА)  $10^{-4}$ , преднизолон - 30 мкг/мл, эуфиллин -  $10^{-4}$ М. В случае использования гелий-неонового лазера суспензию клеток обрабатывали в течение 5 минут при мощности излучения  $2,6 \text{ мВт/см}^2$  с последующей инкубацией в среде 25 минут.

Смешанные культуры клеток инкубировали в течение 0,5; 1; 2; 4; 6; 12 часов при  $37^\circ\text{C}$  в атмосфере 5%  $\text{CO}_2$  с последующим иммунологическим тестированием. В качестве контроля использовали культуры, состоящие из инкубированных в среде без иммуномодулятора и интактных аутологичных мононуклеаров, а также монокультуры интактных или обработанных препаратами МНК.

Для оценки прямого эффекта иммуномодуляторов в подготовленную суспензию МНК или лейкоцитов ( $2,5 \times 10^6$ ) в среде RPMI-1640 вносили различные препараты и инкубировали 30 минут при  $37^\circ\text{C}$ . После инкубации клетки отмывали трижды средой и подвергали иммунологическому исследованию.

Для оценки индивидуальных эффектов иммуномодуляторов на количество Е-РОК и спонтанную миграцию ПЯЛ выбирали разницу между опытом и контролем более 2m, выведенную ранее из исследований здоровых лиц и учитывающую погрешность метода. Считали, что препарат

оказывает стимулирующее или угнетающее действие, если изменение показателя происходило не менее, чем на 12% от исходной величины.

Для определения биологической активности растворимых факторов, образующихся в процессе взаимодействия обработанных иммуномодуляторами и интактных МНК в смешанной культуре, кондиционную среду (супернатанты) смешанных культур в разные сроки культивирования собирали и хранили при  $-20^{\circ}\text{C}$  до использования.

Спонтанную и индуцированную иммуномодуляторами, медиаторами или митогенами подвижность ПЯЛ оценивали в капиллярном варианте реакции миграции лейкоцитов [Д.К.Новиков, В.И.Новикова, 1987]. Результаты выражали в индексах миграции, определяемых по следующей формуле:

$\text{ИМ} = \frac{\text{среднее число мигрировавших клеток (для группы из 5 капилляров) в культуре, содержащей обработанные МНК (или иммуномодуляторы, или супернатанты)}}{\text{среднее число мигрировавших клеток в контрольной культуре}}$

Оценка метаболической активности нейтрофилов производилась в спонтанном и стимулированном вариантах теста восстановления нитро синего тетразолия (НСТ-тест) по методу Baechner, Nathan(1968) с гистохимическим учетом результатов в нашей модификации.

Уровень провоспалительных цитокинов ИЛ-1 $\beta$  и ФНО $\alpha$  в сыворотке крови и в супернатантах культур МНК определяли иммуноферментным методом с помощью тест-систем ООО "Цитокин" (г.С.-Петербург). Для стимуляции продукции цитокинов в культуре мононуклеаров использовали липополисахарид E.coli (Sigma) в конечной концентрации 10 мкг/мл.

Антипролиферативный эффект преднизолона оценивали в реакции бластной трансформации лимфоцитов на ФГА с радиометрическим учетом результатов. Преднизолон добавляли в культуру МНК в дозе одновременно с ФГА (10 мкг/мл). В контроле использовали эквивалентное количество среды.

Статистическая обработка проведена параметрическими и непараметрическими методами вариационной статистики с использованием пакетов прикладных программ Statgrafics Plus (для Windows 2.1). Различия рассматривались как статистически достоверные при уровне значимости  $P < 0,05$ .

### **Результаты исследований и их обсуждение**

Проведенные исследования показали, что обработанные препаратами или He-Ne лазером МНК (или неразделенная суспензия лейкоцитов) в условиях совместного культивирования с аутологичными интактными

лейкоцитами обладают выраженным иммуномодулирующим эффектом. Так, обработанные тималином МНК (как и неразделенная суспензия лейкоцитов), в большинстве случаев (67%) усиливали Е-розеткообразующую активность лимфоцитов (в среднем на  $28,4 \pm 2,2\%$ ,  $P < 0,02$ ), в 73% случаев увеличивали способность нейтрофилов к спонтанной миграции ( $P < 0,01$ ). МНК, обработанные С А, преимущественно (в 63% случаев) увеличивали Е-РОК (в среднем на  $32,4 \pm 3,2\%$ ,  $P < 0,02$ ), усиливали спонтанную и ЛПС-стимулированную продукцию ФНО $\alpha$  мононуклеарами ( $P < 0,01$ ), вызывали обратимую модуляцию МLА-DR-антигена на мононуклеарах, увеличивали функциональный резерв нейтрофилов по результатам НСТ-теста ( $P < 0,02$ ), преимущественно (в 60% случаев) стимулировали спонтанную миграцию этих клеток. МНК, обработанные преднизолоном, в большинстве случаев (56%) угнетали Е-РОК (в среднем на  $25,8 \pm 3,5\%$ ) и снижали способность нейтрофилов доноров к спонтанной миграции (80%). МНК, обработанные He-Ne лазерным излучением, вызывали обратимую модуляцию количества HLA-DR<sup>+</sup>-мононуклеаров, усиливали спонтанную и стимулированную ЛПС продукцию ФНО $\alpha$  МНК ( $P < 0,01$ ). Полученные результаты согласуются с данными других исследователей, описывающих разносторонние иммуномодулирующие эффекты обработанных препаратами МНК в культуре *in vitro* [В.П. Лесков и соавт., 1986; С.М. Юдина, 1995].

Нами проведен сравнительный индивидуальный анализ иммуномодулирующего действия иммуностропных средств и обработанных ими мононуклеаров. Общей чертой их эффекта было отсутствие специфичности действия. Отмечались разнонаправленные реакции (стимуляция, угнетение или отсутствие эффекта) клеток разных доноров на одно и то же воздействие, и, в то же время, сходные изменения экспрессии Е-рецепторов МНК и миграционной активности нейтрофилов были получены под влиянием различных воздействий. Полного совпадения по направлению эффекта иммуностропных средств и обработанных ими мононуклеаров не отмечалось, а в ряде случаев были получены противоположные эффекты.

Другой особенностью действия модифицированных мононуклеаров, по сравнению с прямым внесением иммуномодуляторов в культуру клеток, было достоверно меньшее число наблюдений с отсутствием реагирования ( $P < 0,02$ ). Это видно из таблицы 1, в которой мы суммировали направление эффекта некоторых изученных нами иммуномодуляторов в различных клеточных системах.

Таблица 1.  
Влияние иммуномодуляторов или модифицированных ими МНК на лимфоциты и нейтрофилы доноров

Показатель	Способ воздействия	Эффект, частота выявления в %		
		угнетение	стимуляция	нет эффекта
Е-рецепторы лимфоцитов n = 60	1. Иммуномодулятор	42%	17%	41%
	2. Модифиц. МНК	46%	41%	13%
	P	$P_{1-2} > 0,05$	$P_{1-2} < 0,001$	$P_{1-2} < 0,001$
Спонтанная миграция нейтрофилов n = 35	1. Иммуномодулятор	34%	15%	51%
	2. Модифиц. МНК	47%	47%	6%
	P	$P_{1-2} > 0,05$	$P_{1-2} < 0,001$	$P_{1-2} < 0,001$

Примечание: статистическая значимость (p) различий частот оценивалась методом  $\phi$  углового преобразования Фишера.

Прямой иммуномодулирующий эффект модифицированных МНК подтвержден при исследовании продукции ФНО $\alpha$  в культуре клеток здоровых лиц (табл.2).

Таблица 2  
Влияние иммуномодуляторов и модифицированных ими моноклеаров на продукцию ФНО $\alpha$  МНК доноров ( $M \pm m$ ; n = 6)

Клеточная культура	Уровень ФНО $\alpha$ (пг/мл)		
	спонтанный	индуцирован. ЛПС	ИВ
Контроль-СКЛ	363,0 $\pm$ 46,1	1215,6 $\pm$ 87,7	3,6 $\pm$ 0,5
He-Ne лазер	421,2 $\pm$ 38,7	1208,4 $\pm$ 75,0	2,9 $\pm$ 0,4
He-Ne лазер-СКЛ	595,4 $\pm$ 55,1*(**)	1586,1 $\pm$ 124,2* (**)	2,7 $\pm$ 0,1
СА	759,4 $\pm$ 49,8*	1026,6 $\pm$ 69,9	1,3 $\pm$ 0,05*
СА-СКЛ	892,6 $\pm$ 81,3*	1976,8 $\pm$ 78,3* (**)	2,3 $\pm$ 0,2*(**)
Супернатант монокультур (лазер)	398,7 $\pm$ 44,3	-	-
Супернатант монокультур (СА)	416,4 $\pm$ 59,5	-	-

Примечание: \* - отмечены достоверные различия ( $P < 0,05$ ) по сравнению с контролем. \*\* - отмечены достоверные различия ( $P < 0,05$ ) по сравнению с прямым эффектом соответствующего иммуномодулятора. ИВ - индекс влия-

ния, рассчитанный как отношение величины стимулированной продукции ФНО $\alpha$  к спонтанной. Сокращения: контроль-СКЛ - в культуры интактных клеток внесены МНК, инкубированные без иммуномодулятора; СА (лазер) - прямой эффект иммуномодуляторов (СА, лазера) на культуру клеток; СА (лазер)-СКЛ - культуры клеток, состоящие из модифицированных соответствующим иммуномодулятором и интактных МНК. Супернатант монокультур (лазер, СА) - супернатанты культур клеток, обработанных соответственно лазером или СА.

Как видно из таблицы 2, в монокультурах МНК, обработанных He-Ne лазером, продукция ФНО $\alpha$  не отличалась от контрольных значений, тогда как в смешанных клеточных культурах, содержащих модифицированные и интактные клетки (He-Ne лазер-СКЛ), наблюдалось достоверное ( $P < 0,05$ ) изменение уровня спонтанной и стимулированной ЛПС продукции ФНО $\alpha$ .

При использовании в качестве иммуномодулятора СА спонтанная ФНО $\alpha$  - продукция увеличивалась как в моно-, так и в смешанной (СА-СКЛ) культуре, но стимулированная продукция ФНО $\alpha$  - только в СКЛ. Добавление к интактным МНК супернатантов монокультур модифицированных МНК эффекта на спонтанную продукцию ФНО $\alpha$  не оказывало, что подтвердило необходимость непосредственного межклеточного контакта для развития эффекта.

Полученные результаты согласуются с данными других исследователей, которые указывают на необходимость прямого взаимодействия клеток-регуляторов с клетками-акцепторами для передачи иммуномодулирующего сигнала, и участие мембран-ассоциированных структур иммунокомпетентных клеток, а не секретируемых ими медиаторов, в этом процессе [В.П. Лесков и соавт., 1986; Н.С.Прозоровский и соавт., 1990; В.М.Писарев, 1995]. Это подтверждено в исследованиях, результаты которых представлены в таблице 3.

Выявлено, что во время совместного культивирования обработанных СА, преднизолоном или лазером и интактных моноклеаров наблюдается обратимая модуляция экспрессии HLA-DR антигена на МНК в промежутке времени между 2-6 часами. При раздельном культивировании модифицированных клеток, как и в контрольных СКЛ, такой модуляции не наблюдалось. Выявленная модуляция развивается быстро и сохраняется непродолжительный период времени (в течение 12 часов), что предполагает участие быстро мобилизуемых факторов этих клеток.

В контрольных смешанных культурах отмечалась некоторая стимуляция экспрессии HLA-DR, однако эти изменения не были достоверными. Это связано, вероятно, с модификацией клеточной поверхности в процессе подготовки клеток к культивированию.

Таблица 3

Влияние иммуномодуляторов и обработанных ими МНК на количество (%) МНК, экспрессирующих HLA-DR антигены ( $M \pm m$ ;  $n = 6$ )

Клеточная культура	Количество (%) HLA-DR <sup>+</sup> МНК и время инкубации (час)		
	2	6	12
Контроль	22,4 ± 1,9	20,3 ± 0,6	22,6 ± 2,4
Контроль-СКЛ	24,6 ± 1,9	24,2 ± 1,5	23,2 ± 2,8
СА	23,2 ± 2,3	21,4 ± 1,4	21,2 ± 1,8
СА-СКЛ	30,2 ± 0,5*(**)	31,0 ± 1,1*(**)	23,2 ± 2,2
Преднизолон	22,6 ± 2,2	21,2 ± 1,1	23,6 ± 1,8
Преднизолон-СКЛ	25,2 ± 1,8	27,8 ± 1,1*(**)	22,8 ± 2,3
He-Ne лазер	23,8 ± 1,1	24,4 ± 1,7	26,0 ± 1,7
He-Ne лазер-СКЛ	28,8 ± 1,2*(**)	31,8 ± 1,4*(**)	25,2 ± 1,5

Примечание: \* - отмечены достоверные различия ( $P < 0,05$ ) по сравнению с контролем. \*\* - отмечены достоверные различия ( $P < 0,05$ ) по сравнению с прямым эффектом соответствующего иммуномодулятора. Сокращения: контроль - клетки, инкубированные в среде; контроль-СКЛ - в культуры интактных клеток внесены МНК, инкубированные без иммуномодулятора; СА (преднизолон, лазер) - прямой эффект иммуномодуляторов (СА, преднизолона, лазера) на культуру клеток; СА (преднизолон, лазер)-СКЛ - культуры клеток, состоящие из модифицированных соответствующим иммуномодулятором и интактных МНК.

Таким образом, полученные результаты подтвердили активное межклеточное взаимодействие между модифицированными и интактными мононуклеарами в смешанной культуре, результатом которого является изменение экспрессии поверхностных рецепторов взаимодействующих клеток и их функциональных свойств.

Мы предположили, что в результате такого межклеточного взаимодействия может происходить секреция клетками растворимых факторов, индуцирующих дальнейший иммуномодулирующий эффект. Поэтому на следующем этапе работы была исследована биологическая активность супернатантов краткосрочных аутологичных смешанных культур, содержащих обработанные лазерным излучением или СА и интактные иммунокомпетентные клетки.

В качестве тест-клеток для характеристики биологических свойств супернатантов использовали аутологичные или аллогенные МНК или ПЯЛ, которые инкубировали в среде, содержащей различные разведения супернатантов, после чего оценивали изменение количества Е-РОК, ки-

слород-зависимые метаболические реакции ПЯЛ в НСТ-тесте, спонтанную и ФГА-индуцированную миграцию лейкоцитов. В качестве контроля использовали супернатанты контрольных аутологичных смешанных культур, содержащих МНК, инкубированные в среде без иммуномодулятора, и интактные клетки, а также супернатанты монокультур. Исследования были проведены на клетках 50 здоровых лиц и 45 больных хроническим остеомиелитом.

Выявлено, что в смешанных культурах, содержащих обработанные лазерным излучением или СА моноклеары, происходит секреция растворимых факторов, угнетающих или стимулирующих, в зависимости от ряда условий, спонтанную миграцию аутологичных и аллогенных ПЯЛ. Поочередное превалирование стимулирующих или угнетающих свойств супернатантов в зависимости от разведения и от сроков культивирования СКЛ позволило сделать вывод об одновременном присутствии в супернатантах противоположно действующих факторов. Цельные супернатанты СКЛ больных хроническим остеомиелитом в большинстве случаев (80% наблюдений) проявляли стимулирующую активность, тогда как супернатанты СКЛ здоровых лиц содержали преимущественно угнетающие факторы (65%). При разведении супернатантов в некоторых случаях они приобретали блокирующие свойства, вероятно, за счет проявления ранее скрытой блокирующей активности.

Удаление из культур моноклеаров прилипающих клеток несколько снижало активность накапливающихся в супернатантах факторов, но выявленные тенденции полностью сохранялись.

Наиболее выраженным влиянием на миграцию лейкоцитов обладали супернатанты, полученные через 2-4 часа совместного культивирования обработанных СА или He-Ne и интактных МНК (ИМ соответственно  $1,71 \pm 0,06$ ;  $2,14 \pm 0,09$ ), хотя стимулирующая активность появлялась уже через 0,5 часа (ИМ  $1,23 \pm 0,06$  и  $1,31 \pm 0,06$ ). Эффект 6 и 12-часовых супернатантов был менее выраженным. Для проявления стимулирующего влияния супернатантов требовалось их присутствие в среде инкубации в течение по крайней мере 2-х часов. Удлинение периода инкубирования свыше 4-х часов не усиливало воздействие супернатантов. Так, ИМ лейкоцитов под влиянием супернатантов СКЛ, содержащих модифицированные СА МНК, составил через 4 часа инкубации  $2,85 \pm 0,08$ , а через 12 часов -  $1,65 \pm 0,11$ . В некоторых случаях при 12-часовой инкубации отмечалось даже снижение эффекта, что связано, возможно, с проявлением активности блокирующих факторов. Максимально выраженный стимулирующий эффект на миграцию лейкоцитов наблюдался при концентрации супернатантов 10-20% в конечном объеме суспензии клеток, хотя активность факторов сохранялась даже при разведении в 100 раз.

В супернатантах контрольных СКЛ обнаружена активность, аналогичная супернатантам опытных СКЛ, но с достоверно менее выраженным эффектом на миграцию лейкоцитов. Активность таких супернатантов исчезала уже при разведении более, чем в 5 раз. Это согласуется с вышеприведенными данными о незначительной модуляции экспрессии HLA-DR на МНК в контрольных культурах, а также с результатами других исследователей [В.П. Лесков и соавт., 1986], и связано с активацией клеток в процессе выделения, так как клетки лишаются своей естественной среды обитания. В супернатантах монокультур обработанных иммуномодуляторами или интактных МНК подобной активности не обнаружено (Табл. 4).

Таблица 4

Влияние супернатантов моно- и смешанных культур модифицированных мононуклеаров на спонтанную миграцию нейтрофилов

Используемый супернатант	Индекс миграции и сроки получения супернатантов		
	1 час	2 часа	4 часа
He-Ne лазер-монокультура	0,92±0,06	0,87±0,11	1,12±0,09
He-Ne лазер-СКЛ	1,43±0,08*	1,86±0,12*	1,85±0,12*
СА-монокультура	1,09±0,08	0,94±0,08	1,11±0,07
СА-СКЛ	1,43±0,09*	2,85±0,08*	2,07±0,08*
Контроль-СКЛ	1,14±0,07	1,22±0,09*	1,28±0,16

Примечание: использованы 20% супернатанты МНК больных хроническим остеомиелитом (n=10). Инкубация нейтрофилов с супернатантами - 4 часа. Звездочкой отмечены результаты, достоверно (P<0,05) отличающиеся от спонтанной миграции в среде, принятой за 1. Сокращения использованы как в таблице 3.

Таким образом, проведенные исследования показали, что в результате контактного взаимодействия обработанных иммуномодуляторами и интактных мононуклеаров происходит секреция в среду культивирования растворимых факторов с регуляторной активностью на спонтанную миграцию нейтрофилов.

На следующем этапе работы мы исследовали влияние растворимых факторов супернатантов СКЛ на чувствительность клеток к иммуномодуляторам и митогенам. Для этого мы сравнили эффект иммуномодуляторов на обработанную супернатантом и необработанную тест-культуру клеток. Использовали две схемы эксперимента: 1) преинкубация клеток с супернатантом СКЛ с последующим добавлением иммуномодулятора,

2) обработка клеток иммуномодулятором перед добавлением супернатантов.

Выявлено, что ПЯЛ, предварительно обработанные супернатантами смешанных культур МНК, оказываются более чувствительными к последующему действию иммуномодуляторов. Так, добавление в культуру нейтрофилов СА само по себе не изменяло спонтанную миграцию клеток ( $ИМ=1,05\pm 0,07$ ), но воздействие анатоксином на преобработанные супернатантами с потенцирующей активностью нейтрофилы достоверно усиливало их миграционный ответ ( $ИМ=1,44\pm 0,06$ ,  $P<0,05$ ). Преобработка клеток супернатантами СКЛ усиливала также модулирующий эффект на ПЯЛ преднизолона, пирогенала, эуфиллина. Причем, наблюдалось усиление как ингибирующего, так и стимулирующего эффектов иммуномодуляторов. Так, под влиянием только пирогенала имела тенденция к стимуляции спонтанной миграции нейтрофилов ( $ИМ = 1,28\pm 0,08$ ), но эффект пирогенала на обработанные супернатантами клетки был противоположным ( $ИМ = 0,61\pm 0,14$ ,  $P<0,02$ ). Полученные данные позволяют говорить о том, что факторы, содержащиеся в супернатантах, обладают примиряющим действием на нейтрофилы, повышая чувствительность клеток к иммуномодуляторам. Супернатанты контрольных СКЛ, как и супернатанты модифицированных СКЛ с исходной супрессорной активностью, не обладали таким действием.

В экспериментах, в которых добавление супернатантов к нейтрофилам производилось после их обработки иммуномодуляторами, в большинстве случаев не наблюдалось изменения миграционного ответа клеток. В то же время, отмечена способность физических факторов (He-Ne лазер, УФО) повышать чувствительность тест-клеток к стимулирующему воздействию супернатантов. Однако эффект проявлялся только при исходном наличии в супернатантах стимулирующей активности. ИМ необработанных нейтрофилов в присутствии супернатантов составил  $1,75\pm 0,07$ , после обработки клеток лазером в присутствии тех же супернатантов -  $1,98\pm 0,05$  ( $P<0,05$ ). В случае отсутствия исходного эффекта кондиционной среды СКЛ на миграцию нейтрофилов воздействие на клетки физических факторов не индуцировало ответа на супернатант ее шлю ( $ИМ=1,13\pm 0,09$  и  $1,17\pm 0,08$  соответственно).

Далее было изучено влияние кондиционной среды смешанных культур мононуклеаров на ФГА-индуцированное подавление миграции лейкоцитов. Оказалось, что преинкубация лейкоцитов в кондиционной среде с исходной стимулирующей активностью, усиливала эффект ФГА на миграцию лейкоцитов в прямом варианте реакции миграции клеток из капилляров. ИМ под влиянием только ФГА составил  $0,79\pm 0,07$ , а в присутствии кондиционной среды культур, содержащих модифицированные лазерным излучением МНК, -  $0,51\pm 0,06$ .

Результаты подтвердились в непрямом тесте подавления миграции. Предварительная обработка мононуклеаров супернатантами с исходной потенцирующей активностью на спонтанную миграцию не вызывала продукции факторов угнетения миграции лейкоцитов (ФУМ), но усиливала их ФГА-индуцированную секрецию. ИМ под действием только супернатантов составил  $0,91 \pm 0,12$ ; супернатант+ФГА -  $0,63 \pm 0,06$  ( $P < 0,02$ ). Это говорит о наличии у супернатантов костимулирующего действия. Супернатанты, обладающие исходной супрессорной активностью на спонтанную миграцию, не обладали способностью изменять митоген-индуцированную миграцию, как и супернатанты контрольных СКЛ.

Таким образом, в смешанной культуре интактных и модифицированных иммуномодуляторами МНК прослеживается ряд клеточных реакций, свидетельствующих о контактных взаимодействиях между ними. Наблюдается изменение фенотипических характеристик взаимодействующих клеток, обратимая модуляция экспрессии активационных маркеров, а также секреция веществ с иммунорегуляторной активностью. Последние обладают способностью к примированию мононуклеаров и нейтрофилов к более эффективному ответу на воздействие иммуномодуляторов и митогенов.

С учетом полученных результатов, мы предположили следующий механизм реализации иммуномодулирующего действия обработанных препаратами МНК на интактные клетки. Вследствие контактных взаимодействий модифицированных и интактных аутологичных мононуклеаров происходит формирование двунаправленных сигналов, приводящих к активации взаимодействующих клеток и продукции медиаторов с иммунорегуляторной активностью. Последние в свою очередь способны примировать интактные клетки к более эффективному ответу на иммуномодуляторы, обеспечивая дальнейшее развитие и поддержание иммуномодулирующего эффекта. Такая схема объясняет появление у МНК иммуномодулирующей активности по отношению к интактным клеткам уже через 0,5 часа культивирования с иммуномодуляторами и наличие разнонаправленности в действии самих иммуномодуляторов и модифицированных ими мононуклеаров.

В дальнейших исследованиях мы оценили возможность использования клеточной модели, основанной на взаимодействии обработанных иммуномодуляторами и интактных мононуклеаров (СКЛ-модель), для лабораторного прогнозирования динамики иммунологических показателей и эффективности иммунокоррекции у больных гнойной хирургической инфекцией. Применили метод множественной линейной регрессии с пошаговым включением независимых переменных, основанным на значениях частных коэффициентов корреляций с зависимыми переменными. В качестве независимых переменных использованы наиболее

распространенные в иммунологической лабораторной практике показатели: E-РОК, Ea-РОК, НСТсп, НСТт, которые выражали в виде относительного изменения их значений под влиянием иммуномодулятора *in vitro* по сравнению с контролем. В качестве зависимых переменных использованы относительные изменения этих же показателей под влиянием иммуномодуляторов *in vivo*, рассчитанные по сравнению с их величинами до назначения иммуномодуляторов, а также показатели эффекта лечения, выраженные в баллах. Мы сравнили предсказательную значимость СКЛ-модели и стандартной модели (оценка прямого эффекта иммуномодуляторов на культуру клеток *in vitro*) у больных, получавших в качестве иммунокоррекции по стандартной или экстракорпоральной схеме один из иммунокорректоров - тималин, СА или облучение He-Ne лазером.

Выявлена высокая совпадаемость эффекта иммуномодуляторов на экспрессию E-рецепторов и НСТ-тест *in vitro* в СКЛ-модели с их влиянием на реактивность лимфоцитов и нейтрофилов в процессе экстракорпоральной терапии (60-80%,  $P < 0,04$ ;  $P < 0,02$ ). В то же время, изменение этих же параметров в стандартной клеточной модели (прямое добавление иммуномодулятора в культуру) не соответствовало их динамике при экстракорпоральной терапии и обладало недостоверным коэффициентом детерминации при стандартной терапии (соответствие обнаружено только для действия СА с коэффициентом детерминации 62% на изменение НСТсп ( $P < 0,04$ )).

При сравнении эффекта СА *in vitro* и *in vivo* у здоровых доноров, несмотря на выраженный иммуномодулирующий эффект СА *in vitro*, выявлено полное отсутствие связи между ними. Это указывает на невозможность использования МНК от здоровых лиц для тестирования эффекта иммуномодуляторов.

Оценка прямого действия иммуномодуляторов *in vitro* на иммунокомпетентные клетки обладала прогностической значимостью на эффект лечения только при стандартной терапии (коэффициент детерминации при лечении тималином - 75-77%,  $P < 0,02$ ). Прогнозирование эффективности экстракорпоральной иммунотерапии при гнойно-воспалительных заболеваниях с достаточно высоким коэффициентом детерминации (85-89%,  $P < 0,001$ ) информативно по тестам СКЛ-модели. Наибольшей прогностической значимостью среди изученных маркеров обладал тест определения метаболической активности нейтрофилов (НСТ-тест), что позволило рекомендовать его использование для индивидуального подбора иммунокорректирующих препаратов у больных гнойной инфекцией.

На следующем этапе работы мы апробировали экстракорпоральные методы иммунокоррекции с импульсной обработкой клеток на больных

ревматоидным артритом (РА) и гнойной хирургической инфекцией, а также сравнили полученный клиничко-иммунологический эффект с результатами стандартных схем применения иммуномодуляторов.

Режим проведения ЭИФТ определен на основании данных экспериментальных исследований, показавших, во-первых, появление у мононуклеаров иммуномодулирующей активности по отношению к интактным лейкоцитам уже через 0,5 часов инкубации с иммуномодуляторами; во-вторых, наличие иммуномодулирующего действия на интактные клетки как при работе с мононуклеарами, так и с неразделенной суспензией лейкоцитов. Интервал между процедурами выбран на основании сроков достижения и сохранения наибольшего эффекта с учетом клинических и лабораторных параметров.

Произведена сравнительная оценка клиничко-иммунологической эффективности стандартного (per os) и экстракорпорального применения преднизолон в двух сопоставимых по основным клиническим показателям группах больных РА. Хотя к моменту завершения лечения определенная положительная динамика наблюдалась в обеих сравниваемых группах больных, экстракорпоральная терапия позволила достичь более выраженной степени нормализации основных клинических и лабораторных показателей активности воспалительного процесса: боль при движении (процент изменения при традиционной и экстракорпоральной терапии соответственно  $59,4 \pm 3,5$  и  $81,2 \pm 4,0$ ;  $P < 0,01$ ), скованность ( $41,3 \pm 3,2$  и  $74,3 \pm 5,5$ ;  $P < 0,001$ ), число воспаленных суставов ( $58,4 \pm 4,8$  и  $94,4 \pm 5,1$ ;  $P < 0,001$ ), индекс Ritchie ( $59,7 \pm 3,4$  и  $68,6 \pm 2,1$ ;  $P < 0,02$ ), а также С-реактивного белка и СОЭ. Выраженное противовоспалительное действие ЭИФТ в виде снижения боли в суставах и утренней скованности проявлялось уже после первой процедуры и стабилизировалось по мере продолжения терапии. Длительность клинической ремиссии также оказалась достоверно большей в группе больных, получивших преднизолон экстракорпорально. Так, если в 1 группе (преднизолон per os) ремиссия более 6 месяцев наблюдалась в 13% случаев, то после ЭИФТ преднизолоном - в 73% ( $P < 0,01$  по критерию углового преобразования Фишера).

Побочные эффекты при применении ЭИФТ преднизолоном у больных РА не выявлены, тогда как у гормонозависимых больных, получавших преднизолон per os, наблюдались побочные реакции в виде артериальной гипертензии, акне, явлений кожного васкулита.

У 7 (62%) гормонозависимых больных РА, получивших преднизолон экстракорпорально, удалось снизить дозу стероидов, а в 4-х случаях полностью отменить ГК-контроль. В контрольной группе число гормонозависимых пациентов после лечения увеличилось.

Полученные результаты согласуются с данными О.М. Курбачевой и соавт. (1991), СМ. Юдиной и соавт. (1997), выявивших возможность достижения стойкой ремиссии и отмены ГК у стероидзависимых больных атопическим дерматитом и бронхиальной астмой при использовании аутологичных лейкоцитов, обработанных *ex vivo* ГК в течение 3-х часов. В нашем исследовании обнаружено, что аналогичный клинический эффект может быть достигнут при экстракорпоральном назначении преднизолона у больных РА, с тем отличием, что длительность инкубации лейкоцитов с препаратом составила 30 минут.

Многочисленными исследованиями показана взаимосвязь гормонорезистентности со способностью ГК подавлять пролиферацию лимфоцитов [E.Baus et al., 1996; W.A Briggs et al., 1996; F.Ramires, A. Silva, 1997]. Поэтому мы использовали тест подавления ФГА-индуцированной пролиферации для исследования изменения чувствительности МНК к ГК в процессе ЭИФТ и стандартной терапии. Выявлено, что после стандартного применения ГК антипролиферативное действие преднизолона на культуру клеток *in vitro* снижается (индекс влияния до лечения составил  $0,68 \pm 0,05$ , после лечения -  $0,92 \pm 0,02$  ( $P < 0,01$ ), тогда как ЭИФТ не отменяет ингибирующего действия преднизолона на активацию лимфоцитов (индекс влияния до лечения  $0,67 \pm 0,07$ , после лечения -  $0,66 \pm 0,04$ ).

Полученные результаты продемонстрировали, что ЭИФТ преднизолоном у больных РА, в отличие от стандартной схемы, не вызывает нарушения естественных процессов гормональной регуляции активности иммунокомпетентных клеток. Это подтверждается отсутствием угнетающего действия ЭИФТ на функцию надпочечников. Выявлено достоверное увеличение содержания кортизола в крови больных, получивших ГК экстракорпорально ( $160,3 \pm 21,8$  пмоль/л до лечения,  $343,8 \pm 33,4$  пмоль/л - после лечения,  $P < 0,05$ ).

Одновременно с положительным клиническим эффектом, наблюдалось выраженное иммуномодулирующее действие ЭИФТ преднизолоном у больных РА, что проявлялось нормализацией хелперно-супрессорного соотношения, понижением уровня ЦИК ( $P < 0,02$ ), количества В-лимфоцитов ( $P < 0,05$ ), экспрессии HLA-DR на мононуклеарах ( $P < 0,006$ ). При стандартной терапии заметного изменения степени активации Т-лимфоцитов и активности супрессорных механизмов не выявлено, что может быть причиной неблагоприятного течения заболевания [Т.А.Славянская, Р.И.Сепиашвили, 1998; Г.В.Порядин и соавт., 1998].

В механизме противовоспалительного эффекта ГК существенная роль принадлежит его способности снижать продукцию провоспалительных цитокинов, прежде всего ФНО $\alpha$  и ИЛ-1В, которые являются ключевыми медиаторами воспаления и тканевой деструкции при РА [Е.Л.Насонов и соавт., 1999; P.Tessier et al., 1993; V.Brinkman, C.

Kristofic, 1995; W.Y.Almawi et al., 1996]. Поэтому мы исследовали влияние экстракорпоральной ГК-терапии у больных РА на уровень этих цитокинов в сыворотке, а также спонтанную и стимулированную их продукцию мононуклеарами крови. Выявлено снижение спонтанной и стимулированной продукции ФНО $\alpha$  ( $P < 0,001$ ) и спонтанной продукции ИЛ-1В ( $P < 0,01$ ), с одновременным уменьшением концентрации ФНО $\alpha$  в сыворотке крови ( $P < 0,03$ ) у больных, получавших ЭИФТ. В контрольной группе к концу лечения снижалось содержание в сыворотке крови ФНО $\alpha$  ( $P < 0,05$ ), но при этом отсутствовал нормализующий эффект на продукцию в культуре МНК ФНО $\alpha$  и ИЛ-1В. По-видимому, это связано с разнонаправленными эффектами ГК на продукцию про- и противовоспалительных цитокинов, что показано в экспериментах *in vitro* [А.С.Симбирцев и соавт., 1993; Е.А.Калашникова и соавт., 1996]. Это приводит к одновременной выработке противоположно действующих факторов и препятствует проявлению конечного эффекта. При ЭИФТ имеется возможность более целенаправленного воздействия на клетки, в связи с чем развивается функциональный регулирующий ответ, нормализующий баланс цитокинов.

Таким образом, полученные результаты показали, что ЭИФТ преднизолоном не только подавляет активность РА, но и корригирует лежащие в основе воспалительного процесса иммунологические нарушения, то есть может влиять на механизмы развития болезни, оказывая системное регулирующее действие.

На следующем этапе работы был проведен сравнительный анализ эффективности стандартных и экстракорпоральных методов применения широко применяемых в практике лечения гнойной инфекции иммуномодуляторов - тималина и СА.

Тималин использовали в комплексной терапии больных сепсисом. ЭИФТ тималином у этих больных оказывала, прежде всего, значительный эффект на выраженность интоксикационного синдрома. Так, проведение только одного сеанса ЭИФТ купировало клинические проявления интоксикации полностью у 60% больных и значительно снизило ее у 40%. Стандартное применение тималина в эти же сроки ни у одного больного не купировало интоксикацию полностью, и в 12,5% случаев интоксикация осталась тяжелой. По современным данным накопление продуктов эндотоксикоза препятствует нормальному функционированию клеток иммунной системы, их активации и взаимодействию, что создает условия для резистентности к терапии [В.В.Чаленко, Ф.Х.Кутушев, 1990; А.М.Торбинский, И.И. Шиманко, 1991]. С этих позиций можно, вероятно, объяснить быструю положительную динамику в отношении системной воспалительной реакции при ЭИФТ тималином. Отличный эффект лечения с полным купированием всех симпто-

мов патологического процесса был получен у 80% больных, но ни у одного пациента контрольной группы.

Результаты иммунологического контроля также выявили быстрый и выраженный эффект ЭИФТ тималином. Так, уже после первого сеанса, кроме лабораторных признаков признаков уменьшения интоксикации (МСМ,  $P<0,02$ ), отмечалось снижение базального уровня стимуляции нейтрофилов ( $P<0,01$ ), концентрации ЦИК ( $P<0,02$ ) с одновременным увеличением уровня  $CD4^+$  мононуклеаров ( $P<0,05$ ). К моменту завершения лечения была достигнута полная нормализация иммунологических показателей у этих больных, тогда как в контрольной группе сохранялись признаки раздражения системы иммунитета.

Экстракорпоральная схема применения СА апробирована на больных рецидивирующим фурункулезом стафилококковой этиологии и стрептостафилодермией, поскольку для лечения таких больных традиционно используют антигены микроорганизмов [Р.М.Хаитов, Б.В.Пинегин, 2000]. Сравнение результатов стандартной и экстракорпоральной схем применения СА показало, что последняя позволяет достичь клинического эффекта в более короткие сроки. Положительная клиническая динамика в виде снижения температурной реакции, очищения ран, исчезновения пустулезных элементов, ограничения распространения процесса наблюдалась уже после первого сеанса, достигая максимальной выраженности после третьей процедуры. У больных, получивших СА экстракорпорально, отмечено достоверное удлинение межрецидивного периода ( $P<0,02$ ). В течение 2-х лет у 86% больных, рецидивы отсутствовали, что позволяет говорить о выздоровлении. В то же время, у пациентов, иммунизированных СА по стандартной схеме, в большинстве случаев (55%) срок ремиссии не превысил 4-х месяцев. ЭИФТ анатоксином не давала побочных реакций, и в ряде случаев оказывалась высоко эффективной как монотерапия. Полученные данные указывают возможные пути лечения больных хронической гнойной инфекцией, резистентных к антибиотикам, или имеющих противопоказания к их применению, и подтверждают, что в основе лечебного действия экстракорпоральных методов терапии лежит не только их способность усиливать эффект одновременно применяемых фармакотерапевтических средств, но и собственный иммунокорректирующий эффект.

Иммуномодулирующее действие ЭИФТ СА проявлялось усилением экспрессии активационных маркеров мононуклеаров (CD25, HLA-DR;  $P<0,01$ ), повышением активности микробицидных систем нейтрофилов ( $P<0,01$ ), существенным увеличением титра анитоксических антител ( $P<0,01$ ), восстановлением баланса провоспалительных цитокинов (ФНО $\alpha$  и ИЛ-1b) и чувствительности МНК к антигенным влияниям. Эти факторы играют ведущую роль в механизме формирования хрони-

ческого воспалительного процесса [Б.В.Пинегин и соавт., 1998], и их нормализация может служить патогенетической основой лечебного действия экстракорпоральных методов.

Таким образом, проведенные исследования подтвердили клинико-иммунологическую эффективность ЭИФТ с кратковременной обработкой клеток иммуномодуляторами, что позволяет рекомендовать такой подход к экстракорпоральной терапии для практического внедрения. Традиционный подход к ЭИФТ [В.П.Лесков, И.С.Гущин, 1993], а также его модификация [СМ. Юдина, 1995], предусматривающие длительное нахождение клеток в условиях *ex vivo*, могут приводить к травматизации клеток, что нарушает их функциональную активность и снижает эффективность терапии. Усовершенствованный нами метод ЭИФТ, за счет сокращения времени инкубации, минимизирует вышеперечисленные недостатки.

В результате исследований сформулирована новая концепция о механизмах действия ЭИФТ, центральным звеном которой является взаимодействие модифицированных иммуномодуляторами и интактных иммунокомпетентных клеток. Вследствие прямых контактных взаимодействий модифицированных и интактных клеток формируются двунаправленные сигналы, приводящие к активации взаимодействующих клеток и секреции факторов с иммунорегуляторной активностью, изменяющих чувствительность интактных клеток к иммунотропным средствам. Научная значимость такой концепции заключается в расширении и углублении понимания механизмов межклеточных взаимодействий, и возможности ее использования в качестве платформы для разработки патогенетически обоснованного применения экстракорпоральной иммунотерапии.

Проведенные исследования выявили некоторые механизмы лечебного действия модифицированных препаратами аутолейкоцитов и продемонстрировали перспективность экстракорпоральных схем применения иммуномодуляторов в клинической практике с целью повышения эффективности и безопасности терапии. Основываясь на результатах исследований, сформулированы четкие показания для проведения иммунотерапии по экстракорпоральной схеме у больных РА, рецидивирующей гнойной инфекцией.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

1. Лейкоциты крови здоровых лиц и больных гнойно-воспалительными заболеваниями, обработанные в импульсном режиме фармакотерапевтическими (тималин, стафилококковый анатоксин,

преднизолон, эуфиллин) или физическими (He-Ne лазерное излучение) иммуностропными средствами обладают иммуномодулирующим действием в смешанной культуре с аутологичными интактными лейкоцитами, что характеризуется изменением рецепторного аппарата, функционального и цитокинпродуцирующего состояния клеток [1,6,35].

2. Иммуномодулирующий эффект обработанных препаратами мононуклеарных клеток наблюдается только в условиях их прямого взаимодействия с интактными лейкоцитами и сопровождается модификацией экспрессии CD-2 и HLA-DR антигенов мононуклеаров, метаболической и спонтанной миграционной активности нейтрофилов, увеличением спонтанной и ЛПС-стимулированной продукции ФНОα мононуклеарами [6,35]. Эффект обработанных иммуностропными средствами мононуклеаров на интактные клетки в 17-42% случаев по разным тестам не совпадает по направлению и значительно превосходит по выраженности прямое действие этих же иммуномодуляторов на культуру лейкоцитов [6,16,19,30,31,38].

3. Супернатанты краткосрочных 0,5-12-часовых аутологичных смешанных культур обработанных стафилококковым анатоксином или лазерным излучением и интактных мононуклеаров содержат растворимые факторы, разнонаправленно изменяющие спонтанную миграцию интактных аутологичных и аллогенных нейтрофилов здоровых лиц и больных хроническим остеомиелитом [34,36,37,40]. Продукция и биологическая активность факторов зависит от присутствия в клеточной культуре прилипающих клеток, условий и длительности инкубации смешанных культур, индивидуальных особенностей доноров клеток [6,13,36,37]. В супернатантах смешанных культур мононуклеаров больных хроническим остеомиелитом преобладают (80% случаев) стимулирующие спонтанную миграцию нейтрофилов факторы, тогда как в аналогичных супернатантах МНК здоровых лиц чаще (65%) выявляются факторы угнетения миграции [13,37].

4. Супернатанты смешанных культур МНК, обладающие исходной стимулирующей активностью на спонтанную миграцию нейтрофилов, оказывают примиряющее действие на интактные лейкоциты, что проявляется усилением ФГА-индуцированной продукции факторов ингибиции миграции мононуклеарами и миграционного ответа нейтрофилов на иммуномодуляторы [6,40].

5. Разработана клеточная модельная система для индивидуального прогнозирования эффективности экстракорпоральной иммунофармакотерапии стафилококковым анатоксином, тималином и He-Ne лазером при гнойно-воспалительных заболеваниях, основанная на взаимодействии в аутологичной смешанной культуре обработанных препаратами и интактных мононуклеарных клеток пациента [1,8,11,22,27,28,32].

По тестам Е-розеткообразования лимфоцитов и метаболической активности нейтрофилов предсказательная значимость данной модели на эффект лечения составила 85-91%. Оценка прямого эффекта иммуномодуляторов на культуру клеток *in vitro* информативна с коэффициентом детерминации 75-77% только при традиционных схемах их применения [1,10,14,18,20,23,24,29,31]. Наиболее показателен для прогнозирования эффективности экстракорпоральной и стандартной терапии при гнойно-воспалительных заболеваниях тест оценки метаболической активности нейтрофилов [3,4,8,11,21,23,41].

6. На основании модельных исследований в аутологичной смешанной культуре обработанных иммуномодуляторами и интактных лейкоцитов разработана технология экстракорпоральной иммунофармакотерапии гнойно-воспалительных заболеваний и ревматоидного артрита, предусматривающая на этапе подготовки клеток кратковременную импульсную обработку лейкоцитов иммуномодуляторами [1,17,22,25,26].

7. Экстракорпоральная иммунофармакотерапия преднизолоном у больных ревматоидным артритом по разработанной методике оказывает быстрый и продолжительный лечебный эффект, что проявляется снижением уже после первой процедуры на 40% и 36% соответственно болевого синдрома и утренней скованности, достижением состояния относительной клинической ремиссии к моменту завершения лечения у 91% больных, удлинением межрецидивного периода на срок более 6 месяцев в 73% случаев. Применение преднизолона по экстракорпоральной схеме не вызывает привыкания, снижает потребность в глюкокортикоидах, позволяя в ряде случаев отменить постоянный ГК-контроль; увеличивает уровень кортизола в сыворотке крови [15,22,42].

8. Экстракорпоральная иммунофармакотерапия преднизолоном у больных ревматоидным артритом приводит к коррекции ряда иммунологических нарушений: нормализует соотношение иммунорегуляторных субпопуляций Т-лимфоцитов, уменьшает экспрессию маркеров активации (HLA-DR) на мононуклеарах, снижает исходно повышенный уровень ФНО $\alpha$  в сыворотке крови, спонтанную продукцию ИЛ-1 $\beta$  и ФНО $\alpha$  и ЛПС-индуцированную продукцию ФНО $\alpha$  мононуклеарами крови в культуре *in vitro*, уменьшает содержание ЦИК в сыворотке [15,33,42]. Применение модифицированных аутоМНК не приводит к нарушению чувствительности лимфоцитов больных к антипролиферативному действию преднизолона в культуре *in vitro* [7].

9. Включение в программу комплексного лечения больных сепсисом экстракорпоральной иммунотерапии тималином позволяет в более короткие, чем при стандартной терапии, сроки добиться детоксикационного, иммунокорректирующего и санирующего эффектов, что сопровож-

дается быстрой положительной динамикой в отношении системной воспалительной реакции у больных и позволяет при завершении курса терапии в 80% случаях полностью купировать все симптомы патологического процесса и сократить сроки пребывания больных в стационаре на  $9 \pm 2$  дня [1,9,22,39].

10. ЭИФТ стафилококковым анатоксином как в составе комплексной терапии больных рецидивирующей гнойной инфекцией, так и в виде монотерапии, оказывает выраженное иммунокорректирующее действие на состояние специфического антистафилококкового и неспецифического иммунитета, нормализует исходно повышенное содержание в сыворотке и спонтанный синтез ИЛ-1 $\beta$ , увеличивает спонтанную и ЛПС-индуцированную продукцию ФНО $\alpha$  в культуре МНК [5,12,26,39]. Клинический эффект ЭИФТ проявляется отсутствием рецидивов заболевания в течение 2 лет наблюдения у 86% пациентов [2,12,22,39].

### ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1). В схему лечения больных ревматоидным артритом целесообразно включать экстракорпоральное применение преднизолона в следующих случаях:

- наличие противопоказаний для назначения ГК по стандартной схеме;
- наличие противопоказаний или выраженных побочных эффектов при применении нестероидных противовоспалительных препаратов и базисных средств;
- резистентность к предшествующей терапии нестероидными противовоспалительными препаратами, глюкокортикоидами и базисными средствами;
- необходимость преодоления гормонозависимости;
- быстро прогрессирующее течение заболевания с полиартритами и системными поражениями внутренних органов.

2) Клинико-иммунологические критерии для применения СА по экстракорпоральной схеме при гнойно-воспалительных заболеваниях:

- хроническое течение гнойно-воспалительных заболеваний с частыми рецидивами;
- резистентность рецидивирующих гнойно-воспалительных заболеваний к предшествующей терапии;
- наличие противопоказаний или выраженных побочных эффектов при антибиотикотерапии и стандартном применении СА;
- нарастающие симптомы иммунологической недостаточности на фоне рецидивов заболевания, проявляющиеся низким уровнем

активации Т-лимфоцитов, дисбалансом иммунорегуляторных субпопуляций, низким уровнем продукции цитокинов воспаления, снижением активности микробицидных систем нейтрофилов, низкими титрами специфических антител.

3) Для лабораторного прогнозирования эффекта экстракорпоральной иммуномодуляции рекомендуется использовать клеточную модель, основанную на взаимодействии обработанных препаратами и интактных лимфоцитов в аутологичной смешанной культуре. Для лабораторного мониторинга больных гнойной хирургической инфекцией наиболее целесообразно применение теста восстановления нитротетразолиевого синего в спонтанном и стимулированном вариантах.

4) Для проведения ЭИФТ у больных ревматоидным артритом и гнойно-воспалительными заболеваниями предлагается использовать, как высокоэффективный, биотехнологический подход, предусматривающий на этапе подготовки клеток кратковременную импульсную обработку лейкоцитов иммуномодуляторами.

## **СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ**

### **МОНОГРАФИЯ**

1.Новикова И.А., Булавкин В.П. Современные аспекты иммунодиагностики и иммунокоррекции в гнойной хирургии. - Витебск, 2001. - 140 С.

### **СТАТЬИ В НАУЧНЫХ И НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКИХ ИЗДАНИЯХ**

2. Булавкин В.П., Новикова И.А., Осадчий В.М. Эффективные методы иммунокоррекции у больных гнойной хирургической инфекцией // Новости хирургии. - 2000. - № 1-2. - С. 14-20.

3. Булавкин В.П., Новикова И.А., Кирпиченок Л.Н., Хотетовская Ж.В. Коррекция нарушений иммунного гомеостаза у больных гнойной инфекцией // Механизмы регуляции гомеостаза организма: Сб.ст. - Витебск, 1994.-С. 118-121.

4. Булавкин В.П., Новикова И.А., Полуян Ю.С., Хотетовская Ж.В. Оценка результатов комплексного лечения больных хроническим остеомиелитом // Вопросы патогенеза и терапии инфекционных и паразитарных заболеваний: Сб.ст.- Витебск,1993. - С.73-75.

5. Новикова И.А. Динамика провоспалительных цитокинов у больных гнойной инфекцией при экстракорпоральной иммунотерапии ста-

филококковым анатоксином // Медицинские новости.-2001.- N 3. - С. 70-71.

6. Новикова И.А. Изучение механизмов действия обработанных различными иммуномодуляторами аутологичных лейкоцитов *in vitro* // Иммунопатология, аллергология, инфектология. - 2000. - N3.-С.18-27.

7. Новикова И.А. Особенности пролиферативного ответа Т-лимфоцитов больных ревматоидным артритом в динамике терапии преднизолоном // Медицинская иммунология. - 2000. - Т.2, N4.-С.435-438.

8. Новикова И.А. Подходы к лабораторному прогнозированию эффективности экстракорпоральной иммуофармакотерапии // Медицинские новости. - 2001. - № 9. - 78-80.

9. Новикова И.А., Булавкин В.П. Клинико-иммунологическая эффективность применения тималина по экстракорпоральной схеме у больных сепсисом // Патогенез, клиника, диагностика и фармакотерапия заболеваний человека: Сб.ст.- Витебск, 2000. - С.169-172.

10. Новикова И.А., Булавкин В.П. Методы подбора иммунокорригирующих средств у больных хроническим остеомиелитом // Сов. медицина. - 1991. - N 11. - С.75-77.

11. Новикова И.А., Булавкин В.П. Некоторые аспекты иммуномодулирующей терапии гнойной хирургической инфекции // Актуальные проблемы современной медицины: Сб. ст.- Витебск, 1994. - С. 56-57.

12. Новикова И.А., Булавкин В.П. Новые подходы к иммуномодулирующей терапии рецидивирующей гнойной инфекции // Вестник ВГМУ.-2001.- N1. - С.69-73.

13. Новикова И.А., Булавкин В.П., Уланова Е.А. Иммунологические критерии оценки активности и коррекции системы иммунитета // Эндокринные и иммунные механизмы регуляции гомеостаза: Сб.ст. - Смоленск, 1991. - С.111-113.

14. Новикова И.А., Булавкин В.П., Хотетовская Ж.В. Характеристика иммуномодулирующей активности продуктов нестимулированных лейкоцитов // Проблемы теоретической медицины и фармации: Сб.ст.- Витебск, 1997. - С. 68-70.

15. Новикова И.А., Уланова Е.А., Булавкин В.П. Экстракорпоральное применение глюкокортикоидов при ревматоидном артрите // Здоровоохранение.-2000.- N2.-С.42-44.

16. Новикова И.А., Булавкин В.П., Хотетовская Ж.В., Махлин Л.Б. Иммунологические аспекты действия стафилококкового анатоксина при различных иммунореактивных процессах // Механизмы регуляции гомеостаза организма: Сб. ст. - Витебск, 1994. - С.132-135.

17. Новикова И.А., Булавкин В.П., Ермолова Т.А., Осадчий В.М., Хотетовская Ж.В. Новые подходы клинического применения кортико-

идных средств у больных ревматоидным артритом // Теоретические и прикладные вопросы современной медицины и фармации: Сб.ст.- Витебск, 1996. – С.91-93.

18. Новикова И.А., Махлин Л.Б., Булавкин В.П., Уланова Е.А., Хотетовская Ж.В. Информативность определения маркеров иммунологической реактивности в условиях иммунизации// Проблемы профилактической медицины: Сб.ст.- Витебск, 1995. – С.15-17.

19. Новикова И.А., Новиков Д.К., Уланова Е.А., Булавкин В.П., Хотетовская Ж.В. Способ первичного скрининга химических соединений на иммуномодулирующую активность // Новые методы диагностики, лечения, реабилитации заболеваний и оценки лекарственных форм: Сб.ст. - Витебск, 1991.- С.23-25.

#### АВТОРСКИЕ СВИДЕТЕЛЬСТВА И ПАТЕНТЫ

20. А.с. N 1704084 СССР, МКИ G 01 N 33/53. Способ первичного скрининга химических соединений на иммуномодулирующую активность / И.А.Новикова, Д.К.Новиков, Е.А.Уланова (СССР). – № 4669970/14; Заявл. 30.03.89; Опубл.07.01.92, Бюл. № 1 // Открытия. Изобретения.- 1992. - № 1.

#### МЕТОДИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

21. Булавкин В.П., Новикова И.А., Осадчий В.М. Комплексное применение методов фотомодификации крови в гнойной хирургии: Метод. рекомендации / Витебский гос. мед. ин-т. – Витебск. – 1994. – 22 с.

22. Новикова И.А., Булавкин В.П., Осадчий В.М., Уланова Е.А. Комплексная экстракорпоральная коррекция иммунологической недостаточности у больных хирургического и терапевтического профиля: Метод. рекомендации / Витебский гос. мед. университет.- Витебск. – 1999. – 15 с.

23. Сачек М.Г., Булавкин В.П., Новикова И.А. Применение иммунокорректирующих средств в гнойной хирургии и прогнозирование их эффективности: Метод. рекомендации / Витебский гос. мед. ин-т. – Витебск, 1991. – 19 с.

#### ТЕЗИСЫ ДОКЛАДОВ И СТАТЕЙ

24. Bulavkin V. P., Novikova I. A. Clinical and laboratorial evaluation of efficiency some antiseptics for treating purulent pathology // Programme and Abstracts-7th International Congress for Infections Diseases, Hong-Kong. – 1997. – P.77.

25. Булавкин В.П., Новикова И.А. Эффективность экстракорпорального применения тималина при гнойно-септических хирургических заболеваниях // Актуальные проблемы иммунологии и аллергологии:

Тез. докл. III съезда Белорусского научного общества иммунологов и аллергологов, Гродно, 1995 / Гродненский гос. мед. ин-т. – Гродно, 1995. – С. 13-14.

26. Bulavkin V. P., Novikova I. A., Adaskevich V.P. Efficiency of various methods of Staphylococcal anatoxin application in purulent infections // Programme and Abstracts-8th International Symp. of Staphylococci and Staphylococcal infections. Aix-les-Bains, France. 23-26 June, 1996.- Paris, 1996. – P.202.

27. Булавкин В.П., Новикова И.А., Осадчий В.М. Иммунокоррекция больных гнойной хирургической инфекцией лазерным облучением аутокрови // Оптимальные средства и методы иммунокорригирующей, противовоспалительной и противомикробной терапии: Тез. докл. научно-практич. конф./ Харьковск. мед. ин-т. – Харьков, 1993. – С.46.

28. Булавкин В.П., Новикова И.А., Осадчий В.М. Критерии применения низкоинтенсивного лазерного излучения в комплексной терапии гнойной инфекции // Актуальные вопросы лазерной медицины и операционной эндоскопии: Сб. тр. 3-ей Международной конференции Московского региона. – Москва, 1994. – С. 92-93.

29. Булавкин В.П., Новикова И.А., Сачек М.Г. Иммунологический контроль эффективности лазеротерапии у больных гнойно-воспалительными заболеваниями // Лазерная и магнитная терапия в экспериментальных и клинических исследованиях: Тез. докл. Всероссийск. симп. / НИИ мед радиологии АМН СССР. – Обнинск, 1993. – С.138-140.

30. Булавкин В.П., Осадчий В.М., Новикова И.А. Механизм иммуномодулирующего действия квантовых методов терапии // Материалы III Белорусской научно-практической конференции «Эфферентные и физико-химические методы терапии» 23-25 октября 1998 г. - Могилев, 1998. - С. 37-39.

31. Булавкин В.П., Новикова И.А., Сачек М.Г., Осадчий В.М. Прогнозирование эффективности лазерного облучения крови у больных гнойной хирургической инфекцией // Материалы Всесоюзного симп. «Низкоинтенсивные лазеры в медицине». - Обнинск, 1991. – Т.2. - С. 21-23.

32. Булавкин В.П., Новикова И.А., Окулич В.К., Тетюева А.Н., Лапоухов Г.Д. Оценка эффективности антисептиков в комплексном лечении гнойных ран // Тез. докл. I Белорус. междунар. конгресса хирургов, Витебск, 1996 г.– Витебск, 1996. – С.161-163.

33. Новикова И.А. Динамика уровня провоспалительных цитокинов при различных схемах применения глюкокортикоидов у больных ревматоидным артритом // Актуальные вопросы иммунологии и аллергологии: Материалы IV съезда Белорусского научного общества иммунологов и

аллергологов, Гомель, 15-16 июня 2000 г./ Гомельский гос. мед. ин-т. – Гомель, 2000. – С.241-243.

34. Новикова И.А. Иммуномодулирующие свойства растворимых продуктов нестимулированных лейкоцитов // Тез. докл. 2 съезда иммунологов России, 6-10 сентября 1999, Сочи / Russ. J. Immunol. – 1999. – N 4, Suppl.1. – P.52.

35. Новикова И.А. Различный эффект иммуномодуляторов на экспрессию рецепторов лимфоцитов в зависимости от способа воздействия в экспериментальной системе *in vitro* // Актуальные вопросы теоретической и практической медицины: Тез. докл. 55-ой науч. сессии ВГМУ, Витебск, 17-18 февр. 2000 г. / Витебский гос. мед. университет. – Витебск, 2000. – С. 12-13.

36. Новикова И.А., Булавкин В.П. Эндогенные иммунорегулирующие факторы при гнойно-септических заболеваниях // Актуальные проблемы иммунологии и аллергологии: Тез. докл. III съезда Белорусского научного общества иммунологов и аллергологов, Гродно, 1995 / Гродненский гос. мед. ин-т. – Гродно, 1995. – С. 46-47.

37. Novikova I. A., Bulavkin V. P. Endogenous factors in the regulation of intercellular interaction // Joint Annual Meeting, Vienna, Sept. 27-30, 1995 / Immunobiology. – 1995. – Vol. 76, N1-3. – P.342.

38. Novikova I. A., Bulavkin V. P. Immunological aspects of Staphylococcal  $\alpha$ -toxin (ST) and anatoxin (SA) effect under immunisation // Programme and Abstracts-8th International Symp. of Staphylococci and Staphylococcal infections. Aix-les-Bains, France. 23-26 June, 1996. – Paris, 1996. – P.217.

39. Новикова И.А., Булавкин В.П. Подходы к экстракорпоральной терапии гнойной хирургической инфекции // Тез. докл. I Белорус. междунар. конгресса хирургов, Витебск, 1996 г. – Витебск, 1996. – С.272-274.

40. Novikova I. A., Bulavkin V. P. The effect of soluble products of non-stimulated leukocytes on cell migration // Abstr.13th European Immunology Meeting, Amsterdam, 22-25 June 1997. – Amsterdam, 1997. – P.408.

41. Novikova I. A., Bulavkin V. P., Khotetovskaya J.V. The condition of immunological reactivity at the donors immunized by staphylococcal anatoxin // Abstr.8th Int. Congress of Infectious Diseases. Boston, USA. 15-18 May, 1998. – Boston, 1998. – P.278.

42. Novikova I. A., Bulavkin V. P., Ermolova L.A., Osadtchi V.M., Ulanova E.A. The efficiency of extracorporeal treatment by immunodepressants in rheumatoid polyarthritis // Abstr.4th Int. Symp. of Clinical Immunology, Amsterdam, 22-25 June 1997. – Amsterdam, 1997. – P.128.

## РЭЗЮМЕ

Новікава Ірына Аляксандраўна

### БІЯТЭХНАЛАГІЧНЫЯ І МЕДЫЦЫНСКІЯ АСПЕКТЫ ЭКСТРАКАРПАРАЛЬНАЙ ІМУНАФАРМАКАТЭРАПІІ

*Ключавыя словы:* імунамадулюючая тэрапія, прагназіраванне эфекту, змешаная культура фармакамадыфіцыраваных і інтактных аўталагічных монануклеараў, экспрэсія рэцэптараў, прадукцыя цітакінаў.

*Прадмет даследавання:* клетачныя і гумаральныя фактары імунітэту, паказчыкі цітакінавага і эндакрыннага статусу.

*Мэта даследавання:* Разработаць біятэхналагічныя падходы і медыцынскія крытэрыі экстракарпаральнай імунафармакатэрапіі гнойна-запаленчых захворванняў і рэўматоіднага артрыту на падставе выяўлення заканамернасцей і механізмаў узаемадзеяння абработаных імунамадулятарамі і інтактных імунакампэтэнтных клетак.

*Па выніках выкананых даследаванняў* распрацаваны арыгінальны падыход да вывучэння механізмаў лячэбнага ўздзеяння экстракарпаральнай імунафармакатэрапіі, заснаваны на даследаванні аўталагічнай змешанай культуры фармакамадыфіцыраваных і інтактных імунакампэтэнтных клетак. Паказана, што рэалізацыя імунамадулюючага эфекту фармакамадыфіцыраваных монануклеараў адбываецца праз непасрэднае ўзаемадзеянне з інтактнымі клеткамі і вызначаецца змяненнем іх структура-функцыянальнага і цітакінпрадуючага стану. Сфармулявана гіпотэза аб механізме імунамадулюючага дзеяння мадыфіцыраваных прэпаратамі монануклеараў на інтактныя клеткі. Распрацавана, тэрэтычна абгрунтавана і выпрабавана на хворых рэўматоідным артрытам і гнойнай інфекцыяй арыгінальная метадыка экстракарпаральнай імунафармакатэрапіі, заснаваная на лячэбным уздзеянні аўталагічных імунакампэтэнтных клетак, апрацаваных у імпульсным рэжыме імунатропнымі сродкамі. Распрацаваны лабараторныя імуналагічныя крытэрыі індывідуальнага прагназіравання эфектыўнасці экстракарпаральнай імунафармакатэрапіі пры гнойна-запаленчых захворваннях.

*Вынікі працы выкарыстоўваюцца* у практычнай медыцыне для планіравання тактыкі і выбару спосабу экстракарпаральнай імунатэрапіі. Таксама яны могуць быць выкарыстаны ў біятэхналогіі з мэтай атрымання лячэбных прэпаратаў на падставе аўталагічных імунакампэтэнтных клетак.

БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИЕ И МЕДИЦИНСКИЕ АСПЕКТЫ  
ЭКСТРАКОРПОРАЛЬНОЙ ИММУНОФАРМАКОТЕРАПИИ

*Ключевые слова:* иммуномодулирующая терапия, прогнозирование эффективности, смешанная культура фармакомодифицированных и интактных аутологичных мононуклеаров, экспрессия рецепторов, продукция цитокинов.

*Предмет исследования:* клеточные и гуморальные факторы иммунитета, показатели цитокинового и эндокринного статуса.

*Цель работы:* разработать биотехнологические подходы и медицинские критерии экстракорпоральной иммунофармакотерапии гнойно-воспалительных заболеваний и ревматоидного артрита на основе выявления закономерностей и механизмов взаимодействия обработанных иммуномодуляторами и интактных иммунокомпетентных клеток.

*В результате выполненных исследований* разработан оригинальный подход для изучения механизмов лечебного действия экстракорпоральной иммунофармакотерапии, основанный на исследовании аутологичной смешанной культуры фармакомодифицированных и интактных мононуклеаров. Показано, что реализация иммуномодулирующего эффекта фармакомодифицированных мононуклеаров происходит через прямое взаимодействие с интактными клетками, и определяется изменением их структурно-функционального и цитокинпродуцирующего состояния. Сформулирована гипотеза, объясняющая механизм иммуномодулирующего действия модифицированных препаратами мононуклеаров на интактные клетки. Разработана, теоретически обоснована и апробирована на больных ревматоидным артритом и гнойной инфекцией технология экстракорпоральной иммунофармакотерапии, основанная на лечебном воздействии аутологичных мононуклеаров, обработанных в импульсном режиме иммуностропными средствами. Разработаны лабораторные иммунологические критерии индивидуального прогнозирования эффективности экстракорпоральной иммунофармакотерапии при гнойно-воспалительных заболеваниях.

*Результаты работы используются* в практической медицине для планирования тактики и выбора способа иммунокорректирующей терапии. Могут применяться в биотехнологии для получения лечебных препаратов на основе аутологичных иммунокомпетентных клеток.

## S U M M A R Y

Novikova Irina Alexandrovna

### **BIOTECHNOLOGICAL AND MEDICAL ASPECTS OF THE EXTRACORPORAL IMMUNOPHARMACOTHERAPY**

*Key words:* the immunomodulatory therapy, prognosis of effectiveness, mixed culture of pharmacomodified and intact autological mononuclears, receptor expression, cytokine production.

*The objective of study:* the factors of cellular and humoral immunity, the parameters of cytokine and endocrine state.

*The aim of study:* to elaborate the biotechnological approaches and medical criteria of the extracorporal immunopharmacotherapy of purulent diseases and rheumatoid arthritis on the base of the determined mechanisms of interrelationship of pharmacomodified and intact immunocompetent cells.

*The data obtained:* As a result of performed study the original approach for curable effect mechanism investigation of the extracorporal immunopharmacotherapy based on the investigation of autological mixed culture of pharmacomodified and intact immunocompetent cells has been elaborated. The realization of immunomodulatory effect of pharmacomodified mononuclear cells occurs by means of the direct interrelationship with the intact cells and is determined by changes of their structure-functional and cytokine-produced condition. The hypothesis was proposed to explain the mechanism of the immunomodulatory effect of mononuclears modified by preparations on the intact cells. The original method of the extracorporal immunopharmacotherapy has been worked out, theoretically based and approved in the patients with rheumatoid arthritis and purulent infection. This method is based on the curable effect of autological leukocytes treated in the impulse regimen by immunotropic preparations. The laboratory immunological criteria of individual prognosis of the extracorporal immunopharmacotherapy effectiveness in the purulent inflammatory diseases have been worked out.

*The results may be used* in the practical medicine for planning tactics and the choice of the method of immunocorrection and in the biotechnology for curable preparation production on the base of autological mononuclears.

