

ЛИТЕРАТУРА

1. Бимбас Е.С. Отбеливающие зубные пасты: за и против? [Текст]/ Е.С. Бимбас, Е.С. Иошенко, Ю.В. Мандра, Е.Н. Светлакова// Дентал Юг, 2008, № 5. С. 20-21.
2. Грудянов А.И. Заболевания пародонта. [Текст]/ А.И. Грудянов. - М., Медицинское информационное агентство, 2009. - 336с.
3. Кисельникова Л.П. Влияние зубных паст на биохимические параметры смешанной слюны. [Текст]/ Л.П.Кисельникова// Институт стоматологии, 2008. -№4. - С. 88-91.
4. Курякина Н.В., Савельева Н.А. Стоматология профилактическая (руководство по первичной профилактике стоматологических заболеваний). [Текст]/ Н.В. Курякина, Н.А. Савельева. – М.: Медицинская книга, Н. Новгород: Издательство НГМА.- 2003. – 288 с.
5. Леонтьев В.К. Профилактика стоматологических заболеваний. [Текст]/ В.К. Леонтьев, Г.Н. Пахомов. – М., 2006. 416 с.
6. Николаев А.И. Практическая терапевтическая стоматология. Учебное пособие [Текст]/ А.И.Николаев, Л.М.Цепов.- М., Медпресс-информ, 2007. - 928 с.
7. Орехова Л.Ю. Заболевания пародонта. [Текст]/ Л.Ю. Орехова. - С.-Пб., Полимедиапресс, 2004. 432 с.
8. Улитовский С.Б. Индивидуальная гигиеническая программа профилактики стоматологических заболеваний. [Текст]/ С.Б. Улитовский. - Москва: Медицинская книга, Н. Новгород: Издательство НГМА.- 2003. - 292 с.

ИЗУЧЕНИЕ ВОЗМОЖНОСТИ ПРИМЕНЕНИЯ 2-ДИМЕТИЛАМИНОЭТАНОЛА ДЛЯ КОРРЕКЦИИ ВОЗРАСТНЫХ ИЗМЕНЕНИЙ КОЖИ

Васильева М.С., Зверева А.Е., Улыбин А.И., Зубанов П.С.

Научный руководитель – д.м.н., профессор О.Г. Макеев

ГОУ ВПО Уральская Государственная Медицинская Академия Росздрава

ГУЗ СО Институт медицинских клеточных технологий

В 2007 году группа ученых под руководством д-ра Франсуа Марсо из Центра ревматологии и иммунологии центральной университетской клиники г. Квебека провела исследование, результаты которого были опубликованы в журнале «British Journal of Dermatology» под названием: «Косметологический эффект местного применения 2-диметиламиноэтанола (DMAE) связан с патологической вакуолизацией клеток». В выполненной работе приведена попытка объяснения механизма разглаживания морщин при использовании распространенного в косметологической практике средства DMAE массовой вакуолизацией фибробластов в течение первых двух суток после применения препарата, то есть быстрый омолаживающий эффект происходит за счет механического «раздувания» клеток изнутри. Авторы предположили, что таким образом наблюдалось цитотоксическое действие на дермальные фибробласты аминов, к которым относится также и DMAE [7].

В свою очередь, широкое применение препаратов DMAE в косметологии придает высокую актуальность проблеме обоснованности дальнейшего использования DMAE в качестве средства для коррекции возрастных изменений кожи.

Основываясь на этом, была определена цель исследования: выяснить возможность безопасного применения DMAE для коррекции возрастных изменений кожи.

Материалы и методы

В экспериментах использовали постнатальные культуры человеческих фибробластов и мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток (ММСК). Культуры фибробластов были выделены из собственного слоя человеческой дермы (все доноры женского пола, возраст: 45-56 лет). Фрагмент дермы для выращивания культуры забирали с ягодичной области под местной анестезией. В исследовании применяли клеточные линии, полученные из эксплантатов 5 доноров.

Культуры ММСК получали из жировой ткани человека (возраст доноров: 47-59 лет) в соответствии с общепринятыми методиками. В работе использовали линии клеток, выращенные из ткани 4-х пациентов. На клетках всех линий определялся высокоспецифичный для ММСК маркер Stro-1. Окончательным подтверждением соответствия выделенных культур ММСК служило установление их способности к дифференцировке в адипогенном, остеогенном и хондрогенном направлениях [1, 4].

Все клеточные линии прошли необходимые тесты на генетическую нестабильность и отсутствие контаминации ВИЧ, гепатитами (А, В, С), ЦМВ, микоплазмой и хламидиями. Таким образом, все клеточные культуры, использовавшиеся в эксперименте, являлись оригинальными постнатальными линиями, аналогичными тем типам клеток, с которыми косметологические средства вступают во взаимодействие *in vivo*.

Культивирование производилось на среде DMEM/ Ham's F 12 с добавлением 10% фетальной бычьей сыворотки (ФБС) и антибиотиков в «культуральных» концентрациях. Культивирование проводили при 37°C, 95% влажности и 5% CO₂ в составе газовой фазы среды. Ежедневно производили микроскопический контроль состояния культуры с использованием тёмнопольной и фазово-контрастной микроскопии [3, 5, 6].

Для исследования использовали стабилизированный препарат 2-диметиламиноэтанол 4-ацетоамидбензоат, 6% раствор (производства компании Alianza, Бразилия). Для эксперимента готовили

концентраты растворов в расчёте на конечное содержание чистого DMAE в объёме среды культивирования клеток.

Влияние DMAE на фибробласты исследовали в следующих концентрациях: 3,4; 11,0; 34,0; 67,0; 112,0 мМоль/л. ММСК культивировали с концентрацией DMAE 34 мМоль/л. В каждой линии обоих типов клеток оставляли контрольные матрасы, в которых клетки культивировали без добавления DMAE.

Жизнеспособность клеток измеряли через 1, 4, 8, 12, 24 и 96 часов. Максимальную экспозицию (96 часов) применяли для концентраций 3,4; 11,0 и 34,0 мМоль/л. Короткие экспозиции исследовали при воздействии всех перечисленных концентраций.

Для анализа жизнеспособности использовали традиционный метод окрашивания клеточной взвеси трипанговым синим с подсчетом в камере Горяева.

Влияние DMAE на пролиферативную активность оценивали в пробах с 4 и 96-часовой экспозицией при воздействии концентрации DMAE 34,0 мМоль/л. Применялся метод включения меченого ^2H -тимидина. Меченый тимидин в дозе 37 кБк на мл среды вносили в клеточные культуры за сутки до планового завершения эксперимента.

Клетки, предварительно отмытые центрифугированием от свободного тимидина, инкубировали в 5% растворе муравьиной кислоты на холоду с целью разрушения клеточных мембран, осаждали на миллиметровые фильтры, подсушивали и радиометрировали в простом толуоловом сцинтилляторе на жидкостном сцинтилляционном счётчике Бета-2 с последующим расчетом.

Оценка параметров митотического цикла проводилась по стандартной методике [2] с применением радиоавтографии. В качестве селективной метки использовали высокомеченый ^3H -тимидин. Тимидин вносили в среду клеточных культур, выращенных на покровных стёклах, в дозе 37 кБк/мл среды. Параметры митотического цикла рассчитывали в соответствии со стандартной методикой.

Качественный анализ морфологических изменений в клетках проводили с использованием гистологических методов. Культуру фибробластов высевали на стёкла, после адгезии клеток в среду добавляли DMAE в концентрации 0,3% и выдерживали 24 часа. Затем стёкла обрабатывали метиловым спиртом (для фиксации препаратов) и окрашивали.

Применяли следующих виды окраски: азур-эозин, альциановый синий, окраску по Маллори, ШИК-реакцию, окраску по Гамори, окраску суданом Б, окраску муцикармином.

С целью оценки Stro-1 позитивной фракции клеток препарат окрашивали иммунофлуоресцентным красителем к рецепторам Stro-1.

Для проведения морфологических исследований использовали инвертированный микроскоп Olympus СКХ и прямой микроскоп Olympus СХ4 с системой фотовидеоокументирования Olympus.

Статистическая достоверность данных, полученных во всех экспериментах, оценивалась с использованием критерия Стьюдента.

Результаты исследования

I. Оценка влияния препарата DMAE на постнатальные первичные культуры дермальных фибробластов человека.

Введение в культуральную среду препарата DMAE в концентрациях 3,4; 11,0; 34,0; 67,0 и 112,0 мМоль/л сопровождалось вакуолизацией цитоплазмы культивируемых фибробластов. В процессе исследования оказалось, что вакуолизация появляется после двухчасового воздействия DMAE, а к четвертому часу достигает максимального уровня. При этом степень вакуолизации прямо зависит от концентрации DMAE в среде. В дальнейшем (через 8, 12, 24 и 96 часов) морфологическая картина не сопровождалась сколько-нибудь заметной динамикой вакуолизации (рис. 1, рис. 2).

Полученные результаты свидетельствуют о том, что для визуализации DMAE-обусловленных внутриклеточных изменений необходим 2-3 часовой лаг-период, в течение которого происходят основные события, приводящие к вакуолизации. При последующем культивировании морфологическая картина стабилизируется, по-видимому, за счет установления динамического равновесия между концентрацией DMAE в культуральной среде и степенью вакуолизации. В свою очередь, состояние клеток может определяться как последствиями вакуолизации, так и прямой цитотоксичностью DMAE.

В процессе исследования выявлено, что стабилизированный препарат DMAE в течение первых 12 часов воздействия на клетки в широком диапазоне концентраций (от 3,4 до 112 мМоль/л) не оказывает сколько-нибудь значимого цитотоксического эффекта по сравнению с контрольными культурами. Однако, спустя сутки, проявление цитотоксического действия становится значимым при концентрации DMAE 112 мМоль/л (снижение доли жизнеспособных клеток на 11,8%), а через 96 часов – уже при меньших концентрациях DMAE в среде (при концентрации 34 мМоль/л выявляется снижение доли жизнеспособных клеток на 18,4 %).

Полученные результаты, в целом, согласуются с данными, представленными в статье канадских авторов, продемонстрировавших появление вакуолизации уже при воздействии концентраций DMAE от 2,5 до 10 мМоль/л. Однако такие концентрации не вызывают гибели клеток даже при длительной (до 4 суток) экспозиции и, вероятно, являются относительно безопасными. Достоверное уменьшение жизнеспособности за такой период способна вызвать лишь существенно большая концентрация DMAE – 34 мМоль/л.

II. Механизм цитотоксического действия DMAE

Выявленная цитотоксичность при высоких дозах и продолжительной экспозиции может быть следствием DMAE-обусловленного торможения основных клеточных функций, таких как энергетическая или

метаболическая. Вместе с тем, их прямое ингибирование через блокаду ферментов или ферментативных комплексов должно проявляться падением жизнеспособности и гибелью клеток уже в первые часы после воздействия токсического вещества. В то время как в экспериментах цитотоксическое действие находило проявление или через сутки экспозиции с препаратом DMAE в высокой концентрации, достигающей 1% объема среды, или в меньшей концентрации (0.3%) к четвертым суткам воздействия препарата.

Полученные экспериментальные данные дают основание предполагать, что цитотоксический эффект DMAE реализуется не через торможение основных метаболических путей, а через иные механизмы, не затрагивающие ключевые клеточные функции. К таким механизмам может быть отнесено воздействие DMAE на процессы клеточного деления.

Используемые в наших исследованиях первичные культуры фибробластов в стандартных условиях культивирования характеризуются умножением клеточной массы в геометрической прогрессии. Так, в контрольных культурах, используемых в настоящей работе, клеточная масса возрастала с 20 тысяч клеток до 340,5 тысяч – к четвертым суткам культивирования.

Внесение препарата DMAE в цитотоксической концентрации 34 мМоль/л в адгезированные на поверхности флаконов культуры и экспозиция клеток с препаратом в течение 96 часов сопровождалась снижением выхода клеток в 13 раз – до 28 тысяч клеток.

Зарегистрированная остановка деления фибробластов на фоне цитотоксического эффекта может быть как результатом прямой блокады деления клеток (по типу цитостатикоподобного действия), так и опосредованного торможения ответа клеток на рост-индуцирующие факторы культуральной среды. В последнем случае подтверждением подобного механизма может служить обратимость эффекта DMAE.

Клетки, культивированные с DMAE в концентрации 34 мМоль/л в течение 24 часов, затем трёхкратно отмывые и помещенные в стандартные условия культивирования еще на 96 часов в количестве 20 тысяч жизнеспособных клеток восстанавливали популяцию до значения, сопоставимого с контролем – 318 тысяч. Из полученных результатов следует, что воздействие DMAE на процессы клеточного деления, по-видимому, опосредовано через систему внутриклеточной сигнализации, блокада которой, с одной стороны, прямо не повреждает клетки, а с другой – обеспечивает переход клеток в фазу G₀ клеточного цикла. По-видимому, эффект высоких концентраций DMAE состоит в торможении специфического митогенного влияния факторов роста, содержащихся в эмбриональной сыворотке

При анализе полученных данных, на фоне регистрируемого торможения клеточного деления, обращает внимание некоторое увеличение числа клеток после 96 часовой инкубации с DMAE (p<0,05). Данный феномен становится объяснимым, если принять во внимание, что реализация пролиферативного ответа клеток фибробластического дифферона обеспечивается в основном за счет ранних прогениторных клеток, образующихся при дифференцировке ММСК, которые при воздействии DMAE, вероятно, сохраняют потенциал не только к пролиферации, но и к дифференцировке в ранние предшественники фибробластов (рис. 2).

Количество ММСК в коже существенно меньше, чем в костном мозге или жировой ткани и снижается с возрастом. Однако, их достаточно для воспроизводства фибробластов в коже в естественных условиях. Так, исследование последствий четырехчасового воздействия DMAE в концентрации 34 мМоль/л на культуры фибробластов с использованием фазово-контрастной микроскопии позволило подтвердить предположение о том, что клетки, морфологически близкие ММСК, не подвергаются вакуолизации.

Таким образом, следует предположить, что пролиферативный потенциал ММСК не изменится независимо от присутствия в среде DMAE (табл. 1).

Таблица 1

Доля жизнеспособных клеток (в %) и включение 2¹⁴С-тимидина в ДНК (в Бк на 10⁶ клеток) в культурах фибробластов и ММСК под влиянием препарата DMAE в концентрации 34 мМоль/л через 4 и 96 часов культивирования

Тип клеток		Дермальные фибробласты		ММСК	
Время и условия культивирования		контроль	DMAE	контроль	DMAE
4 часа	жизнеспособные клетки	90.4 ± 3.6	93.0 ± 2.5	94.0 ± 1.8	93.6 ± 3.0
	включение 2 ¹⁴ С-тимидина	15.5 ± 2.9	5.8 ± 1.7 *	8.9 ± 2.3	9.3 ± 3.2
96 часов	жизнеспособные клетки	94.8 ± 4.1	77.4 ± 5.5 *	92.2 ± 3.3	92.2 ± 4.1
	включение 2 ¹⁴ С-тимидина	19.5 ± 1.0	2.7 ± 0.3 *	9.0 ± 1.6	8.8 ± 2.4

* значимость отличий от соответствующего контроля при p ≤ 0.05

Полученные результаты свидетельствуют о том, что еще до появления цитотоксического эффекта DMAE синтез ДНК в культивируемых фибробластах резко снижается, а по достижении этого эффекта становится еще более выраженным. Данное проявление наблюдается на фоне массивной вакуолизации. В тоже время, ММСК не подвержены DMAE-обусловленной вакуолизации и в полной мере сохраняют жизнеспособность и синтетический потенциал.

Означенное дает основание предполагать взаимообусловленность процессов вакуолизации и интенсивности синтеза ДНК. По-видимому, вакуолизация и нарушение передачи митогенного стимула через систему внутриклеточной трансигнализации могут быть связаны между собой. При этом определенную роль может играть содержимое вакуолей. Применение широкого спектра красителей не позволило получить

сколько-нибудь стабильного окрашивания содержимого вакуолей, что указывает на их преимущественно водное содержимое. Последнее может свидетельствовать об осмотическом механизме DMAE-обусловленной вакуолизации.

Вероятно, эффект, появляющийся при воздействии DMAE, связан с блокадой рециклинга рецепторов трансигнализации на мембране, что обуславливает обратимую вакуолизацию зрелых клеток и их массовый переход в гетеросинтетическую интерфазу.

Определение механизма действия DMAE на культивируемые зрелые фибробласты оставляет открытым вопрос о позитивных эффектах DMAE *in vivo*, в частности об объяснении таких проявлений, как увеличение тонуса и толщины кожи при внутрикожном введении препарата.



Рис. 1. Нормальные фибробласты

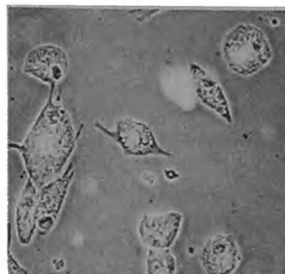


Рис. 2. Вакуолизованные фибробласты

III. Последствия действия DMAE на дермальные клетки

Одним из возможных механизмов наблюдаемого эффекта может являться компенсаторная стимуляция пролиферации ММСК (табл. 2)

Таблица 2

Доля Stro-1 позитивных клеток в культурах дермальных фибробластов
в расчёте на 10^3 жизнеспособных клеток (в %)

Показатель	Доля Stro-1 позитивных клеток в первичных клеточных культурах	Доля Stro-1 позитивных клеток после 96 часовой экспозиции DMAE	Доля Stro-1 позитивных клеток после удаления DMAE и 96 часового культивирования в стандартных условиях
Stro-1 позитивные клетки (на 10^3 жизнеспособных)	$1,66 \pm 0,35$	$12,43 \pm 4,81 *$	$5,09 \pm 3,12 *$

* значимость отличий от данных первичных культур при $p < 0,05$

Так, отмывка клеток и культивирование в стандартных условиях сопровождается некоторым статистически не значимым ($p > 0,05$), снижением доли Stro-1 позитивных клеток, вероятно за счет дифференцировки ММСК в ранние прогениторные клетки, которые утрачивают маркер Stro-1 и обеспечивают активное наращивание клеточной массы. При этом значимое превышение доли Stro-1 позитивных клеток по сравнению с первичными клеточными культурами сохраняется ($p < 0,05$).

Полученные результаты подтверждают представление о том, что воздействие DMAE приводит к возрастанию в культуре содержания ММСК, обеспечивающих поддержание роста клеточной популяции.

Проведенное исследование митотического цикла свидетельствует о том, что 96 часовое воздействие DMAE с последующим 96 часовым культивированием в стандартных условиях приводит к сокращению профазы (на 31,5%) и времени всего митотического цикла на 19%.

Представленные данные свидетельствуют о том, что воздействие DMAE обуславливает обновление популяции культивируемых клеток за счет ранних прогениторных клеток фибробластического дифферона, обладающих способностью к активному делению и, благодаря этому, более высокой скоростью прохождения митотического цикла.

В свою очередь, компенсаторная пролиферация и дифференцировка ММСК в прогениторные формы может составлять материальную основу обновления клеток дермального слоя кожи.

Комплексное влияние DMAE позволяет объяснить как местный позитивный эффект при мезотерапии, заключающийся в увеличении турновера (от англ. turnover – оборот, обновление) с видимым увеличением тонуса и эластичности кожи у пациентов, так и общий анти-age эффект парентерального введения, проявляющийся увеличением продолжительности жизни организма.

Выводы

1. При действии DMAE наблюдаются обратимые изменения цитоплазмы клеток, обусловленные вакуолизацией. Цитотоксический эффект проявляется на 1-4 сутки, зависит от концентрации препарата и выражается в торможении клеточного деления в культурах фибробластов, но не в культурах ММСК.

2. Механизм действия DMAE на культивируемые клетки, вероятно, связан с блокадой рециклинга рецепторов трансигнализации на мембране фибробластов.

3. DMAE активирует пролиферацию Stro-1 позитивных клеток, за счет чего восстанавливается популяция клеток фибробластического дифферона.

4. DMAE рекомендуется применять в косметологии короткими курсами, с перерывами не менее 3 месяцев.

ЛИТЕРАТУРА

1. Бозо И.Я. Паравальнарные ткани – новый источник ММСК? //Клеточная трансплантология и тканевая инженерия. - 2008. - Т III. - № 4. - с. 17-19.
2. Епифанова О.И., Терских В.В., Захаров А.Ф. Радиоавтография. - М. - Выс. Шк.. - 1977. - 246 с.
3. Макеев О.Г. и др. Перспективы применения аутогенных клеток для коррекции возрастных изменений кожи //Вестник УГМА - Екатеринбург. - 2006. - №15. - с. 22-38.
4. Макеев О.Г., Зубанов П.С., Улыбин А.И., Медведева С.Ю.. Возможность получения трехмерной конструкции хряща из мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток //Вестник Уральского медицинской академической науки. - 2008. - № 4. - с. 71-73.
5. Макеев О.Г., Улыбин А.И., Зубанов П.С., Малишевская Е.Г.. Использование аутологичных культивируемых дермальных фибробластов для коррекции дефектов кожи //Вестник эстетической медицины. - М.. - 2008. - №2. - с. 4-19.
6. Макеев О.Г., Улыбин А.И., Зубанов П.С. Патент № 2345781 «Способ получения культуры клеток кожи» //Бюллетень изобретений №4. 10.02.2009.
7. Marceau F., Morissette G., Germain L. The antiwrinkle effect of topical concentrated 2-dimethylaminoethanol involves a vacuolar cytopathology //British Journal of Dermatology. - 2007. - № 156 (3). - p. 433–439.

ИЗМЕНЕНИЕ УРОВНЯ ЭКСПРЕССИИ CD8 АНТИГЕНОВ НА ПОВЕРХНОСТИ МЕМБРАН НАТИВНЫХ И УФ-МОДИФИЦИРОВАННЫХ Т-ЛИМФОЦИТОВ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА В ПРИСУТСТВИИ РАЗЛИЧНЫХ КОНЦЕНТРАЦИЙ α -ИНТЕРФЕРОНА

Вдовина В.А.

Научные руководители – д.б.н., профессор Артюхов В.Г., д.б.н., профессор Путинцева О.В.
Кафедра биофизики и биотехнологии ГОУ ВПО «Воронежский государственный университет»

Выраженные стимулирующие свойства крови, облученной оптическим излучением, составной частью которого является УФ-свет, обусловили ее широкое применение в современной медицине [10]. УФ-модификация цельной крови и ее форменных элементов существенно влияет на антигенный профиль мембран клеток, изменяя уровень экспрессии ряда поверхностных антигенов и рецепторов. Выявлено, что облучение УФ-светом в терапевтических дозах индуцирует структурные изменения поверхности клеток крови, шеддинг надмембранных компонентов, изменение мембранозависимых свойств и функций клеток [1, 3, 6]. Несмотря на обширный экспериментальный материал по исследованию влияния УФ-излучения на состояние компонентов иммунной системы до сих пор остается неясным, какие механизмы лежат в основе фотоиндуцированного изменения антигенного профиля иммунокомпетентных клеток и биологического ответа различных субпопуляций этих клеток на действие УФ-света. Известно, что УФ-излучение принимает участие в процессах модуляции уровня цитокинов, в частности, интерферонов [14], которые в свою очередь играют важную роль в функционировании иммунной системы, являясь иммуномодуляторами широкого спектра действия [7, 11]. В настоящее время в клинической практике эффективно применяется интерферонотерапия для лечения больных с различными типами патологий [4, 8]. В связи с этим определенный интерес представляет исследование влияния УФ-света, α -интерферона и их совместного действия на антигенраспознающую способность цитотоксических и супрессорных Т-лимфоцитов. Основными рецепторами данной популяции Т-клеток являются CD8 маркеры. Известно, что корцепторные молекулы CD8 определяют специфику распознавания антигена Т-киллерами, повышают сходство Т-клеточного рецептора (TCR) к комплексу МНС-антиген, участвуют в регуляции активности Т-клеток и увеличивают эффективность стимуляции их антигеном [12, 13].

Цель исследования – изучение влияния УФ-излучения, α -интерферона и их сочетанного действия на уровень экспрессии CD8 рецепторов на поверхности мембран Т-лимфоцитов крови человека.

Материалы и методы исследования

Эксперименты были проведены на клетках крови 15 доноров. Лимфоциты выделяли из гепаринизированной крови методом седиментации на градиенте плотности фиколл-урографина (1,077 г/см³). Разделение клеток на Т- и В- субпопуляции осуществляли по методу Р. Terasaki [5, 9]. Облучение суспензий Т-клеток (2·10⁷ клеток в 1 мл) проводили светом ртутно-кварцевой лампы ДРТ-400 в термостатируемой кювете (37 °С) через светофильтр УФС-1 с полосой пропускания 240 – 390 нм в дозах 151, 453, 906, 1359 Дж/м². Нативные и фотомодифицированные Т-лимфоциты инкубировали с препаратом человеческого лейкоцитарного α -интерферона (Микроген, Москва) – в концентрациях 0,01; 0,1; 1; 10 и 100 МЕ/мл в среде RPMI 1640 в течение 24 ч при 37 °С. Определение уровня экспрессии CD8 антигенов осуществляли методом